

PAMELA VÍQUEZ ARAYA

MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA (HF-LPME) PARA A DETERMINAÇÃO  
DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA) EM ÁGUAS NATURAIS EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Química, no curso de  
Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas,  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

CURITIBA

2016

Viquez Araya, Pamela

Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em águas naturais empregando cromatografia a gás acopladas a espectrometria de massas (GC-MS) / Pamela Viquez Araya .

– Curitiba, 2016.

129 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Marco Tadeu Grassi

Bibliografia: p. 112-126

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Cromatografia a gás. 3. Microextração em fase líquida. I. Grassi, Marco Tadeu. II. Título.

CDD 547.61

TERMO DE APROVAÇÃO

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA (HF-LPME)  
PARA A DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPA) EM ÁGUAS NATURAIS EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADAS A ESPECTOMETRIA DE  
MASSAS (GC-MS)**

por

**PAMELA VÍQUEZ ARAYA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi  
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. César de Castro Martins  
Cento de Estudos do Mar – UFPR



Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 25 de maio de 2016.

*Un instante es suficiente para pensarte y sentir la mayor de las alegrías por tenerte a mi lado. Tu compañía, las luchas en común, la empatía, la ayuda incasable, el humor, el dolor, un beso, nuestro amor. Tu amor infinito. La distancia nunca cupo entre nosotros. Las siempre existentes dudas solo enriquecen nuestra vivencia, acomplexan nuestros pensamientos y los transforman en conversaciones interminables. Contigo aprendí a amar el tiempo y el contratiempo, mis sospechas respecto a la vida. Nuestra compenetración desvanece las palabras.*

*A mi Jeff*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu esposo e amigo Jeff o amor incondicional e inesgotável, manifestado de diversas formas desde o início da nossa história. A companhia, as discussões filosóficas, as conversas de todos os dias, o apoio e respeito em todas às minhas ideias, a paciência, a compreensão com as minhas decisões, o compartilhar de tanto conhecimento, a dedicação do meu bem-estar, o tempo investido em sonhar comigo e, a mudança maravilhosa da minha vida por te ter a meu lado.

A meus pais pelo carinho e apoio incansável ao longo do caminho percorrido da minha vida, o respeito às minhas ideologias, o respaldo às minhas decisões, que sempre permitiram a concretização das minhas propostas acadêmicas e pessoais. A meus irmãos Tony e Daniel, a minha irmã Belinda e a minha sobrinha e afilhada Antonella por formar parte das minhas conquistas.

A todos meus queridos amigos por ter me acompanhado à distância estes dois anos e meio de mestrado, me mostrando inúmeras vezes seu apoio e carinho neste e outros projetos de vida. À Aída pela sabedoria, inspiração e amor desde o primeiro momento da nossa amizade, a identificação do sentir e a compatibilidade afetiva. À Priscila por estar disponível 24/7 me mostrando sempre uma companhia a apoio constantes, as conversas filosóficas, a amizade construída ao longo deste processo. Ao “Negro” e à Bibi pelos abraços distantes e manifestações de amor. A meu afilhado Farid pelas diversas demonstrações de amor.

Agradeço a minha amiga Raquel ser tão amiga, tão solícita, tão presente na minha vida, sempre disponível para me ajudar de alguma maneira, os momentos felizes, a amabilidade, as conversas, o apoio, a ajuda nas diversas atividades acadêmicas, a confiança e a amizade. À Karynn pelas conversas interessantes, por me questionar e me ampliar o panorama do bem-estar animal, a empatia, a disposição, a sinceridade, a solidariedade e a amizade.

A meu orientador o Professor Marco Tadeu Grassi, por me receber no Grupo de Química Ambiental na minha chegada no Brasil, permitindo me inserir com mais profundidade e dedicação na química ambiental.

Ao Professor Patricio Peralta Zamora por ter me acolhido desde o primeiro momento com seu carisma característico. A colaboração desinteressada e ajuda constante durante o desenvolvimento do trabalho me causando reflexões respeito às minhas propostas, enriquecendo este trabalho de pesquisa.

À Professora Noemi por ter colaborado em diversas ocasiões na minha dissertação, o ensino abrangente da estatística e a disciplina de Métodos Multivariados de Calibração da pós-graduação ministrada de forma tão excelente.

Ao meu coorientador Bruno José Gonçalves da Silva pelas orientações e sugestões.

Aos integrantes do Grupo de Química Ambiental, pela disposição e colaboração desde a minha chegada no Brasil. À Sheisa pela leitura crítica do meu trabalho de dissertação, ajuda fundamental para enriquecer linguisticamente e cientificamente esta pesquisa. Ao pessoal do TECNOTRATER, em especial a minha colega Bianca pela paciência e disposição, por compartilhar tanto conhecimento durante meu trabalho me mostrando sua excelente compreensão estatística e seus diversos aportes nas análises estatísticas e capacitações no uso dos diferentes softwares estatísticos. Ao pessoal do Laboratório de Química Ambiental, LabQAM da Universidade Federal do Paraná pela agradável companhia nas atividades acadêmicas.

Aos professores de português do Centro de Línguas, CELIN, da Universidade Federal do Paraná, o ensino da língua portuguesa e a inserção na cultura brasileira.

Ao curso de Pós-Graduação em Química, do Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná. À CAPES. À Organização dos Estados Americanos, OEA, por me oferecer tão grande oportunidade de realizar o mestrado no Brasil.

*“Yo era demasiado buena para lo mala que me hubieran deseado, o demasiado mala para lo buena que me  
trataban de hacer”*

*Yolanda Oreamuno*

## RESUMO

A presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nos diferentes compartimentos ambientais tem sido associadas a efeitos tóxicos e carcinogênicos, entre outros efeitos à saúde humana; dentre estes, 16 HPA são classificados como poluentes prioritários pela Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA). Devido às baixas concentrações destes contaminantes presentes nas matrizes ambientais, é indispensável a aplicação de métodos analíticos que incluam técnicas de separação e detecção para amostras multicomponentes. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na otimização de uma técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para a determinação simultânea de 16 HPA em amostras de água doce natural. Assim, foram desenvolvidos três planejamentos fatoriais para estudar as principais variáveis que afetam a eficiência da extração, mediante a determinação das melhores respostas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os parâmetros cromatográficos foram inicialmente adaptados da literatura a partir de um método estabelecido para a análise destes compostos, tendo sido posteriormente otimizadas as melhores condições para obter a separação, identificação e quantificação de todos os HPA. Após a otimização da HF-LPME, o método foi validado por meio da avaliação das figuras de mérito, tais como a linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão através de duas curvas analíticas, uma instrumental construída com padrões e a outra mediante a extração de soluções aquosas fortificadas com padrão. A maioria dos compostos apresentou boa linearidade obtendo valores de  $R^2$  na faixa de 0,861 a 0,998. Os valores dos LOD variaram entre 0,0006 e 0,1346  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os LOQ entre 0,0037 e 5,7472  $\mu\text{g L}^{-1}$ , demonstrando uma alta sensibilidade do método. A precisão e exatidão foram avaliadas por meio de estudos de recuperação pela fortificação em água ultrapura com solução padrão, obtendo recuperações entre 59,8 e 99,9 % com desvios padrões relativos (%DPR) desde 0,01 até 30,1 %, valores em sua grande maioria contidos dentro dos limites aceitos pela literatura para análises com concentrações traço (% R entre 40-120 %) e (DPR < 30%). Assim, de maneira complementar foi aplicado o método a 3 amostras de água de rio em zonas próximas e dentro de Curitiba, capital do Estado do Paraná, Brasil; a saber, nos rios Belém, Iguaçu e Irai, corpos hídricos de grande relevância tanto para o desenvolvimento econômico da região quanto para a sustentabilidade ambiental da área com a maior densidade populacional do Estado. Os resultados da determinação destes poluentes nos pontos coletados mostraram a confiabilidade analítica do método otimizado, indicando a presença de antraceno em concentrações de nível traço no rio Belém. A relevância de pesquisas ambientais relacionadas com estes contaminantes orgânicos e a eficiência do método desenvolvido quando aplicado a determinações reais, destaca vantagens tais como um menor tempo de extração, baixo volume de solventes, baixo custo dos implementos, cumprindo deste modo o alvo ambiental do presente estudo.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Planejamento Fatorial. Otimização. Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME). Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Validação. Curitiba (PR). Rio Belém. Rio Iguaçu. Rio Irai.



## ABSTRACT

The occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the different environmental compartments has been associated to toxic and carcinogenic effects, among other effects to human health; within those, 16 PAH are classified as priority pollutants by the U.S.EPA. Due to the low concentrations of these contaminants present in environmental matrices, it is necessary to develop analytical methods, which include separation and detection techniques for samples with multicomponents. In this way, the objective of this work consisted in the optimization of a hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) technique for the simultaneous determination of 16 PAH in natural fresh water samples. Thus, three factorial plannings were developed to study the main variables that affect the extraction efficiency, through the determination of the best responses by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The chromatographic parameters were initially adapted from literature beginning with an established method for the analysis of these compounds, where the best conditions were optimized subsequently in order to obtain the separation, identification and quantification of all the PAH. After the HF-LPME optimization, the method was validated by means of the evaluation of the figures of merit, such as linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy through both of the analytical curves, one of them, instrumental and built with standards, and the other extracting aqueous solutions fortified with standard. Most of the compounds presented a good linearity, with values of  $R^2$  between 0,861 and 0,998. The LOD values varied between 0,0006 and 0,1346  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and the LOQ values were between 0,0037 and 5,7472  $\mu\text{g L}^{-1}$ , demonstrating a high method's sensitivity. The precision and accuracy were evaluated by studying the recovery of the fortification with standard solution of ultra-pure water, obtaining recoveries between 59,81 and 99,96 % with relatives standard deviations (%RSD) from 0,01 to 30,1 %, values that were mostly within the limits accepted by the literature for trace analysis (% R between 40-120 % and RSD < 30%). In addition, the method was applied to 3 water samples from rivers in and near Curitiba, capital of the State of Paraná, Brazil; these were the Belém, Iguaçu and Irai rivers, bodies of water with an enormous relevance for the economic development of this region and for the environmental sustainability of the area with the highest population density in the State. The results of the determination of theses pollutants in the sampled points showed the analytical reliability of the optimized method, indicating the presence of anthracene at trace level concentrations in the Belém river. The relevance of environmental investigations related to these organic contaminants and the efficiency of the developed method when it was applied to real determinations, considerably highlight its advantages such as a shorter extraction time and a small amount of solvent, accomplishing therefore the environmental target of the present study.

Key-words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Factorial Plannings. Optimization. Hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME). Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Curitiba (PR)-City. Belém River. Iguaçu River. Irai River.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURAS MOLECULARES DOS PRINCIPAIS 16 HPA ESTABELECIDOS PELA U.S. EPA.....	30
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMATÓGRAFO A GÁS.....	35
FIGURA 3	CONFIGURAÇÃO EM FORMA DE “U” E EM FORMA DE “HASTE” PARA HF-LPME.....	64
FIGURA 4	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE HF-LPME	66
FIGURA 5	PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS REFERENTE À CIDADE DE CURITIBA.....	70
FIGURA 6	COLETA DE AMOSTRAS DOS RIOS A) BELÉM B) IGUAÇU C) IRAI.....	71
FIGURA 7	CROMATOGRAMAS REFERENTES A A) MÉTODO A B) MÉTODO B PARA A ANÁLISE DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E O SUBROGADO.....	73
FIGURA 8	CROMATOGRAMAS REFERENTES A A) MÉTODO B) MÉTODO PARA A ANÁLISE DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E O SUBROGADO.....	77
FIGURA 9	GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO FENANTRENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> . VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE.....	82
FIGURA 10	INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> PARA A) ACENAFTILENO B) FENANTRENO E C) FLUORENO.....	84
FIGURA 11	GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO A) FENANTRENO E DO B) DIBENZO[A,H]ANTRACENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> , VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE.....	87

	DIAGRAMA PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	
FIGURA 12	DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> PARA A) FENANTRENO B) DIBENZO[A,H]ANTRACENO.....	88
FIGURA 13	GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO FENANTRENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE.....	90
FIGURA 14	REPRESENTAÇÃO DAS RESPOSTAS EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS ANTES E DEPOIS DE SEREM OTIMIZADOS.....	91
FIGURA 15	RECUPERAÇÕES DE HPA OBTIDAS UTILIZANDO O NITROGÊNIO E O CONCENTRADOR COMO MÉTODOS DE SECAGEM.....	92
FIGURA 16	RECUPERAÇÕES DE HPA OBTIDAS UTILIZANDO ACETONA E SUA AUSÊNCIA NO MEIO AQUOSO.....	93
FIGURA 17	ESTRUTURA MOLECULAR DO SUBROGADO P-TERFENIL-D14.....	94
FIGURA 18	RECUPERAÇÕES DOS HPA E DO P-TERFENIL-D14 E SEUS RESPECTIVOS % DPR PARA QUATRO CONCENTRAÇÕES DIFERENTES EM ÁGUA ULTRAPURA.....	97
FIGURA 19	RECUPERAÇÕES OBTIDAS E SEUS %DPR PARA O RIO BELÉM EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS.....	103
FIGURA 20	RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O RIO IGUAÇU E SEUS %DPR EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS.....	104
FIGURA 21	RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O RIO IRAI E SEUS % DPR EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS.....	105
FIGURA 22	SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS DAS EXTRAÇÕES EM ÁGUA DO RIO IRAI (COR ROSA) E ÁGUA ULTRAPURA (COR AZUL).....	106
FIGURA 23	COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÕES ENTRE ÁGUA ULTRAPURA E OS RIOS BELÉM, IGUAÇU E IRAI COM SEUS % DPR, FORTIFICADAS COM 0,01 µg L <sup>-1</sup> DE HPA E P-TERFENIL-D14.....	107

FIGURA 24	COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÕES ENTRE ÁGUA ULTRAPURA E OS RIOS BELÉM, IGUAÇU E IRAI COM SEUS % DPR, FORTIFICADAS COM 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE HPA E P-TERFENIL- D14.....	107
-----------	---	-----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS HPA.....	22
TABELA 2	CONCENTRAÇÕES DE HPA EM ÁGUAS DOCES SUPERFICIAIS OBTIDAS EM DIVERSAS REGIÕES.....	25
TABELA 3	EVIDÊNCIAS DE CARCINOGENICIDADE E/OU MUTAGENICIDADE DE ALGUNS PROCESSOS INDUSTRIAIS E MISTURAS COMPLEXAS.....	27
TABELA 4	LIMITES MÁXIMOS DA CONCENTRAÇÃO DE ALGUNS HPA EM DIFERENTES CLASSES DE ÁGUA SEGUNDO A LEGISLAÇÃO FEDERAL BRASILEIRA.....	31
TABELA 5	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS SEGUNDO U.S. EPA.....	34
TABELA 6	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE HPA EM ÁGUAS NATURAIS.....	40
TABELA 7	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL $2^3$ .....	47
TABELA 8	EFEITOS PRINCIPAIS DOS FATORES A, B, C.....	48
TABELA 9	EFEITOS DE INTERAÇÃO DOS FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	48
TABELA 10	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS 16 HPA, 5 PADRÕES INTERNOS E O SUBROGADO P-TERFENIL-D <sub>14</sub> CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA O	63
TABELA 11	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO GC-MS PARA ANÁLISE DE 16 HPA, 5 DEUTERADOS E 1 SUBROGADO.....	63
TABELA 12	PLANEJAMENTO $2^3$ PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME.....	68
TABELA 13	PLANEJAMENTO $2^2$ PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME.....	68
TABELA 14	IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DA COLETA DE ÁGUA DE RIO.....	70

TABELA 15	VOLUMES DE EXPANSÃO PARA ALGUNS SOLVENTES TÍPICOS USADOS EM ANÁLISES COM GC.....	76
TABELA 16	TEMPOS DE RETENÇÃO DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E SUBROGADO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS C E D	78
TABELA 17	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOLVENTES AVALIADOS.....	80
TABELA 18	EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^3$ .....	82
TABELA 19	EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^3$ .....	83
TABELA 20	EFEITOS DE TERCEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^3$ .....	83
TABELA 21	PLANEJAMENTO 22 PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME.....	86
TABELA 22	EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^2$ .....	86
TABELA 23	EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^2$ .....	86
TABELA 24	EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO $2^2$ .....	90
TABELA 25	PARÂMETROS OTIMIZADOS DOS TRÊS PLANEJAMENTOS FATORIAIS PARA A HF-LPME.....	93
TABELA 26	FIGURAS DE MÉRITO DOS HPA OBTIDOS A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA INSTRUMENTAL.....	95
TABELA 27	FIGURAS DE MÉRITO DOS HPA OBTIDOS A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA PÓS-EXTRAÇÃO.....	96
TABELA 28	FATORES DE ENRIQUECIMENTO E RECUPERAÇÕES OBTIDAS EM QUATRO CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DESVIOS RELATIVOS EM ÁGUA ULTRAPURA.....	98

	CONDIÇÕES DE MÉTODOS DESENVOLVIDOS NA	
TABELA 29	LITERATURA PARA DETERMINAR HPA COM HF-LPME E GC-MS.....	100
	VALORES DE PRECISÃO INTRA-CORRIDA (%) E	
TABELA 30	PRECISÃO INTER-CORRIDA (%) EM TRÊS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES EM ÁGUA ULTRAPURA...	101
	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA EM	
TABELA 31	AMOSTRAS DE RIO.....	102
	RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA	
TABELA 32	AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO BELÉM (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)......	103
	RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA	
TABELA 33	AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IGUAÇU (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)......	104
	RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA	
TABELA 34	AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IRAI (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)......	105
	CONCENTRAÇÕES ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) DOS HPA OBTIDAS COM HF-	
TABELA 35	LPME PARA AMOSTRAS REAIS DE RIO (N=3) COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)......	109

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
DIHS-SE	- Direct Immersion and Headspace Sorptive Extraction (Extração sortiva de imersão direta e headspace)
DLLME	- Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido)
DPR	- Desvio Padrão Relativo
eV	- Eletron-volts
GARP	- Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
GC-FID	- Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (Cromatografia a Gás acoplada com Ionização de Chama)
GC-MS	- Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas)
GLC	- Gas-Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida a Gás)
GQA	- Grupo de Química Ambiental
GSC	- Gas-Solid Chromatography (Cromatografía Sólida a Gás)
HF-LPME	- Hollow Fiber Liquid Phase Micro extraction (Microextração em fase líquida suportada com fibra oca)
HPA	- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ICH	- International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional sobre Harmonização)
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IL-MNPs	- Ionic Liquid Coated Magnetic Nanoparticles (Nano Partículas Magnéticas Cobertas de Líquido Iônico)
ISO	-International Organization for Standarization (Organização Internacional de Normalização)



IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional para a Química Pura e Aplicada)
K <sub>ow</sub>	- Coeficiente de Partição octanol-água
LVI–GC–MS	- Large Volume Injection Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografia a Gás com Volume Grande de Injeção e Acoplada com Espectrometria de Massas)
LOD	- Limite de Detecção
LOQ	- Limite de Quantificação
LLE	- Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
MASE	- Membrane-assisted Solvent Extraction (Extração de Solvente Assistida por Membrana)
m/z	- Massa/carga
MWCNTs	- Multi-Walled Carbon Nanotubes (Nano tubos de Multi-paredes de Carbono)
MEPS	- Microextraction by Packed Sorbents (Micro extração por sorventes empacotados)
PP	- Polipropileno
PTFE	- Politetrafluoretileno
PVDF	- Polifluoreto de vinilideno
s	- Segundos
SCAN	- Escaneio ou varredura
SIM	- Selective/single Ion Monitoring (Monitoramento seletivo de íons)
SPE	- Solid-Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
SPME	- Solid-Phase Microextraction (Micro Extração em Fase Sólida)
SPNE	- Solid-Phase Nanoextraction (Nano Extração em Fase Sólida)
SBSE	- Stir Bar Sorptive Extraction (Extração Sortiva com Barra de Agitação)
U.S.EPA	- United States Environment Protection Agency (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos)

UDSA-DLLME	- Up-and-Down Shaker-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva assistida por Agitador do tipo para Cima e para Baixo)
UPLC-FD-UV	- Ultraperformance Liquid Chromatography with Fluorescence and UV Detection (Cromatografia Líquida de Ultra Rendimento com Detecção de Fluorescência e Ultra Violeta)
UV	- Ultra Violeta
WLSEME	- Water with Low Concentration of Surfactant in Dispersed Solvent-assisted Emulsion Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva com Emulsão Dispersa assistida por Solvente com Baixa Concentração de Surfactante em Água)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS – HPA .....	21
1.2. OS HPA NA INDÚSTRIA .....	22
1.3. ORIGENS DOS HPA .....	23
1.4. OCORRÊNCIA DOS HPA.....	24
1.5. EFEITOS SOBRE A SAÚDE.....	26
1.6. LEGISLAÇÃO.....	29
1.7. BIODEGRADAÇÃO DOS HPA .....	32
1.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTAIS .....	33
1.8.1. Cromatografia Gasosa.....	34
1.8.2. Princípio.....	35
1.9. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE HPA.....	37
1.9.1. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) .....	40
1.9.1.1. Configuração de duas fases para HF-LPME .....	42
1.9.1.2. Configuração de três fases para HF-LPME .....	44
1.10. PLANEJAMENTO FATORIAL .....	46
1.11. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	49
1.11.1. Parâmetros Analíticos de Mérito .....	50
1.11.1.1. Seletividade .....	50
1.11.1.2. Linearidade .....	50
1.11.1.3. Precisão.....	52
1.11.1.4. Exatidão .....	53
1.11.1.5. Limites de detecção e de quantificação .....	55
1.12.1. Área de estudo: Bacia Hidrográfica do Alto Iguaçu .....	55
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1. INSTRUMENTOS.....	59
3.2. REAGENTES E MATERIAIS .....	60

3.3. LIMPEZA DE VIDRARIA .....	60
3.4. PADRÕES E SOLUÇÕES .....	61
3.5. PREPARO DE AMOSTRA.....	61
3.6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	62
3.7. TESTES PRELIMINARES DOS PARÂMETROS PRINCIPAIS DA HF-LPME	64
3.8. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR HF-LPME .....	65
3.9. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA HF-LPME .....	67
3.10. COLETA E PREPARO DE AMOSTRA DE RIO .....	69
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
4.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	72
4.2. TESTES PRÉVIOS À OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME .....	79
4.3. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA HF-LPME .....	80
4.3.1 AJUSTES FINAIS DA HF-LPME .....	91
4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME.....	93
4.4.1. Parâmetros Analíticos de Mérito .....	93
4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS REAIS DE RIO ...	102
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE 1 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL <math>2^3</math> PARA OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME (N=3) .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE 2 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL <math>2^2</math> PARA OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME .....</b>	<b>128</b>
<b>APÊNDICE 3 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL <math>2^2</math> PARA OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME .....</b>	<b>129</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os efeitos do desenvolvimento tecnológico e econômico da humanidade e seu incremento demográfico desde o início da Revolução Industrial podem se medir infelizmente na presença de contaminantes ao redor do planeta inteiro, inclusive nas zonas despovoadas. Esta presença ubíqua de agentes contaminantes afeta tanto os ambientes naturais quanto as populações humanas urbanas e rurais, com efeitos ainda mais difíceis de conter e resolver para aqueles países com menores recursos econômicos e maiores conflitos sociais. Neste contexto as ciências ambientais hasteiam a bandeira da inovação e desenvolvimento de técnicas para a resolução das consequências da contaminação antropogênica.

### 1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS – HPA

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são caracterizados como sólidos cristalinos e pouco coloridos à temperatura ambiente, hidrofóbicos, com uma baixa reatividade e altos pontos de ebulição. Existem mais de cem combinações diferentes destes compostos presentes no ambiente, com diferentes estruturas lineares ou agrupadas de anéis de benzeno. As propriedades físicas dos HPA variam com sua massa molar, a qual se encontra entre 128 e 278 g mol<sup>-1</sup> para os 16 compostos de interesse deste trabalho. Em sua maioria são apolares ou pouco polares, e sua solubilidade em água diminui à medida que o número de anéis aromáticos dos HPA aumenta (KABZINSKI et al., 2002, SKUPÍNSKA, 2004). Além disso, os HPA apresentam um elevado potencial de adsorção pelas partículas em suspensão no ar e na água, e para a bioconcentração e biomagnificação em diferentes organismos. (CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT, 1994).

Os HPA podem ser divididos em não-substituídos e alquilados, estes últimos são agrupados pelo número de átomos de carbono presentes no grupo alquila substituinte. Um grupo particular homólogo está conformado por todos os isômeros com o mesmo número de átomos de carbono nos grupos substituintes, e pelos HPA não-substituídos, podendo ocorrer várias combinações dependendo do grupo alquil substituinte envolvido. No processo de alquilação dos HPA, os isômeros são produzidos em quantidades diferentes, mas têm propriedades físicas comuns, como a massa molecular e os padrões de fragmentação num espectrômetro de massas. Os íons fragmentados produzidos para cada isômero dentro do

mesmo grupo são tipicamente idênticos, embora suas abundâncias possam variar. Como resultado, é obtido um padrão cromatográfico complexo de componentes parcialmente resolvidos (OLSON et al., 2004). Este é o motivo pelo qual é necessário otimizar um método cromatográfico que possa resolver os 16 HPA numa sequência lógica segundo suas características, particularmente no caso dos isômeros. A TABELA 1 apresenta as propriedades físico-químicas dos 16 HPA que serão estudados: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno.

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS HPA

Substância	M.M g/mol	P.F. °C	P.E. °C	S mg/L	Pv Pa 25 °C	F 25°C	Log K <sub>ow</sub>
Naftaleno	128	80,5	218	31,7	10,4	0,2830	3,37
Acenaftileno	152	95,0	270	16,1	0,89	-	4,07
Acenafteno	154	96,2	277	3,93	0,29	0,1980	3,92
Fluoreno	166	116	295	1,98	$9,0 \times 10^{-2}$	0,1260	4,18
Fenantreno	178	101	339	1,29	$1,6 \times 10^{-2}$	0,1770	4,57
Antraceno	178	216	340	0,073	$8,0 \times 10^{-4}$	0,0129	4,54
Fluoranteno	202	111	375	0,26	$1,2 \times 10^{-3}$	0,1410	5,22
Pireno	202	156	360	0,135	$6,0 \times 10^{-4}$	0,0506	5,18
Benzo[a]antraceno	228	160	435	0,014	$2,8 \times 10^{-5}$	0,0462	5,61
Criseno	228	255	448	0,0020	$8,4 \times 10^{-5*}$	0,0053	5,91
Benzo[b]fluoranteno	255	168	481	0,0012 *	$6,7 \times 10^{-5*}$	0,0385	6,12
Benzo[k]fluoranteno	252	217	481	0,00076	$1,3 \times 10^{-8*}$	0,0126	6,84
Benzo[a]pireno	252	175	495	0,0038	$7,3 \times 10^{-7}$	0,0328	6,50
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276	164	-	0,062	$1,3 \times 10^{-8*}$	-	6,58
Dibenzo[a,h]antraceno	278	270	524	0,00026	$1,3 \times 10^{-8*}$	0,0040**	6,50
Benzo[g,h,i]perileno	276	277	525	0,00026	$1,4 \times 10^{-8}$	0,0032	7,10

\*Dados obtidos a 20°C

\*\* A 267°C

M.M.= Massa molar

S= Solubilidade

P.F.= Ponto de fusão

Pv= Pressão de vapor

P.E.= Ponto de ebulição

F= Proporção de fugacidade

LogK<sub>ow</sub>= Coeficiente de partição octanol/água

FONTES: FERREIRA (2010, p.8)

PEÑA et al., (2003, p.15)

## 1.2. OS HPA NA INDÚSTRIA

Um número reduzido de HPA são utilizados na indústria e suas aplicações se apresentam geralmente na manufatura de tinturas e em sínteses químicas. O antraceno é utilizado na produção de antraquinona, uma importante matéria prima na manufatura de tinturas rápidas, também é utilizado como diluente de conservantes de madeira e na produção de fibras sintéticas, plásticos e monocristais. O fenantreno tem aplicações na manufatura de corantes,

explosivos, pesquisas biológicas e na síntese de drogas. O fluoranteno é um constituinte do alcatrão de carvão e do asfalto derivado do petróleo utilizado como material de camada protetora de tanques e canos de aço e de ferro dúctil para água. A manufatura de alumínio é feita por eletrólise a 970 °C, sendo o ânodo de grafite o mais utilizado. Durante a eletrólise, o ânodo libera HPA, devido ao coque de petróleo com alcatrão que é a matéria prima destes eletrodos (STELLMAN, 1998).

O fluoreno tem aplicações como um intermediário em vários processos químicos, na formação de poliradicaís para resinas e na manufatura de corantes. O acenafteno é utilizado como intermediário na produção de tinturas, farmacêuticos, produtos químicos fotográficos, inseticidas, fungicidas, plásticos, hormônios para o crescimento de plantas, e em pesquisas bioquímicas, químicas e sobre o câncer. Os outros HPA dentro do presente estudo não têm aplicações industriais conhecidas com a exceção de pesquisas científicas. (ATDSR, 2015).

### 1.3. ORIGENS DOS HPA

Os HPA têm três principais origens terrestres. Primeiro, a origem pirolítica, como resultado da combustão incompleta de matéria orgânica sob condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo de formação. Acredita-se que esses HPA são formados pela “quebra” ou “rompimento” da própria matéria orgânica em moléculas menores durante a pirólise, e consecutivamente rearranjados em HPA não alquilados (NEFF, 1979, MEYER & ISHIWATARI, 1993 apud MEIRE, 2007). Segundo, os HPA de origem petrogênica são formados por processos diagênicos (qualquer mudança química, física ou biológica sofrida pela matéria orgânica presente no sedimento após sua deposição inicial, sob condições relativas de baixa temperatura e pressão), que neste caso, remetem a condições de baixa temperatura relativa e sobre longas escalas geológicas de tempo. Essas condições influenciam a composição primária de moléculas alquiladas, onde os HPA são derivados principalmente de material vegetal fóssil (NEFF 1979 apud MEIRE, 2007). E terceiro, os processos diagênicos também podem formar HPA através de precursores biogênicos, como por exemplo, a formação de terpenos, derivados de material vegetal e que potencialmente geram hidrocarbonetos polinucleados como perilenos, retenos e crisenos, assim como alguns compostos derivados de fenantreno (MEYER & ISHIWATARI, 1993, SILLIMAN et al., 1998 apud MEIRE, 2007). Além destas origens, os HPA são encontrados em grande abundância ao longo do Universo, considerando-se que eles se formaram há dois milhares de

milhões de anos após o Big Bang, sendo detectado pelo telescópio Spitzer e analisado pela Administração Nacional de Aeronáutica e Espaço (National Aeronautics and Space Administration, NASA). O estudo dos HPA no Universo fornece o rastreamento da evolução do carbono cósmico (BOERSMA et al., 2013). Desde o ano 2012, a NASA reportou que os HPA submetidos a condições do meio interestelar se transformam através de oxidação, hidrogenação e hidroxilação em compostos orgânicos mais complexos, passos prévios à formação de amino-ácidos e nucleótidos, matéria-prima para o DNA. Isto apoiaria a teoria de que os HPA foram parte essencial para a origem da vida no nosso planeta (ANDERSON, 2015).

#### 1.4. OCORRÊNCIA DOS HPA

Os HPA são compostos quimicamente inativos que conseguem se transportar graças à sua adesão a partículas finas presentes na atmosfera. A dinâmica atmosférica é, desta maneira, o veículo principal que os leva a uma enorme variedade de ambientes, pois eles são depositados da forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada) sobre os mais diversos sistemas aquáticos e terrestres. (GARBAN et al., 2002, ROSE & RIPPEY 2002 apud MEIRE, 2007). Esta deposição os coloca à disposição das colunas de água e à posterior sedimentação, desta maneira promove sua eventual incorporação na cadeia trófica (POLAKIEWICZ, 2008). Esta disposição depende da presença dos HPA em diferentes tipos de corpos de água natural e tal presença tem sido verificada ao redor do mundo como apresentado na TABELA 2, a qual contém resultados de concentrações de HPA em águas doces superficiais obtidos a partir de diferentes estudos.

Tradicionalmente considera-se que os HPA estão presentes em duas fases no meio aquoso, como matéria dissolvida e como matéria particulada. No entanto, existe uma parte, sob condições favoráveis à sua formação, de matéria coloidal. A presença desta terceira fase coloidal tem apresentado uma importante influência no transporte, destino e toxicidade de micro poluentes orgânicos em ambientes aquáticos (BROWN et al., 2003).



TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DE HPA EM ÁGUAS DOCES SUPERFICIAIS OBTIDAS EM DIVERSAS REGIÕES

Matriz	Região	País	Concentrações obtidas de HPA	Referência
Água de rio	--	Espanha	0,001 – 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$	Triñanes et al., 2015
Água de rio	Delta do Rio Yangtze	China	0,013 – 0,64 $\mu\text{g L}^{-1}$	Zhang et al., 2012
Água de rio	Rio SuZhou	China	0,06 – 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$	Fu et al., 2012
Água de canal	Canal Beijing-Hangzhou	China	0,17 – 1,36 $\mu\text{g L}^{-1}$	Wu et al., 2010
Água de rio	Rio Schachtgraben	Alemanha	0,01 – 0,64 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rodil et al., 2007
Água de lago	Lago Maggiore	Itália	0,58 – 2,90 $\text{ng L}^{-1}$	Olivella, 2006
Água de rio	Rio Paraíba do Sul	Brasil	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	Azevedo et al., 2004

Da mesma forma tem sido constatada no território brasileiro, por exemplo, em águas salinas do litoral da Região Sudeste, na Baía de Guanabara, RJ, um estudo em mexilhões encontrou uma concentração de 760,9  $\text{ng g}^{-1}$  (YOSHIMINE, 2012). Em águas de tratamento de resíduos da indústria petrolífera em Sergipe, foi detectada uma concentração de 177,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  (LIMA et al., 2011). Outro trabalho desenvolvido por Maioli et al. (2011) permitiu determinar as concentrações que variaram de 221 a 1243  $\text{ng g}^{-1}$  no complexo estuarino lagunar Mundaú/Manguaba e 228 – 1814  $\text{ng g}^{-1}$  no Rio Paraíba do Sul, nas regiões do Nordeste e Sudeste respectivamente. Por sua vez, Costa et al. (2015) reportou a presença de HPA nos rios Doce e Piracicaba (média de 677,5  $\text{ng L}^{-1}$ ), no estado de Minas Gerais. No Nordeste do Brasil, na Baía de Todos os Santos, Celino et al. (2012) reportou a presença de HPA em águas superficiais (0,0029 – 0,1079  $\text{ng L}^{-1}$ ). No Paraná, os HPA foram determinados em concentrações consideráveis na Bacia Hidrográfica do Alto Iguaçu por Leite (2008) em sedimentos dos diferentes rios que compõem esta bacia (228 – 1814  $\text{ng g}^{-1}$ ). Finalmente, o trabalho de Machado et al. (2014) demonstrou a evolução nas concentrações de HPA nos sedimentos do rio Barigui em Curitiba, de 39  $\text{ng g}^{-1}$  aproximadamente no ano de 1855 até 2350  $\text{ng g}^{-1}$  em 2011, evolução que comprova o caráter de transporte de HPA por parte de rios até sedimentos e eventualmente à biota, incluindo o ser humano.

O caminho das fontes até os rios está diretamente relacionado com o perfil de emissão de cada país. Segundo Carrasco (2013) o Brasil origina suas emissões de HPA principalmente nos incêndios florestais (66%), a China com biocombustíveis (66,4%) e os Estados Unidos

com produtos de consumo (35%), no entanto, outras atividades também contribuem à emissão destes poluentes. Assim, as maiores emissões provêm de processos industriais na forma de resíduos, por exemplo na produção de alumínio, coque e eletrodos de carbono, onde o processo de eletrólise libera HPA. (STELLMAN, 1998; PEREIRA, 2000). Dos mais de 100 HPA encontrados na natureza, 16 HPA são classificados pela União Europeia e a U.S. EPA de interesse ambiental e 6 como possíveis ou prováveis carcinogênicos humanos. Somente cinco dos compostos estudados têm utilidade industrial (intermediários na produção de plásticos, corantes, farmacêuticos, e usados no desenvolvimento de pesquisas químicas e bioquímicas), os outros onze não apresentam aplicações conhecidas (STELLMAN, 1998; ATDSR, 2015).

Na atualidade, a bioenergia é a maior fonte de energia renovável e pode fornecer calor, eletricidade, bem como combustíveis. O carvão é a fonte principal para a geração de energia, seguida pelo vento e a geração de energia hídrica, a biomassa gerada na forma de desperdício sólido é também utilizada para aplicações de geração de energia e calor. A geração de eletricidade a partir de bioenergia tem aumentado linearmente desde o ano 2000, sendo que em 2010 a bioenergia forneceu 280 TWh de eletricidade globalmente, o equivalente a 1,5% da produção elétrica mundial. No entanto, a cinza gerada a partir da combustão de biomassa pode representar uma ameaça ao ambiente devido à presença de HPA e outros compostos potencialmente tóxicos (MASTO, 2015).

### 1.5. EFEITOS SOBRE A SAÚDE

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775 quando o cirurgião inglês Sir Percival Pott fez a primeira descrição do câncer ocupacional por meio de uma associação do câncer em limpadores de chaminés com exposição prolongada a alcatrão e fuligem. Um século mais tarde foi descrito o câncer de pele em obreiros expostos a alcatrão e óleo de xisto. Em 1930, o câncer de pulmão foi descrito em operários em plantas de aço e coque. Em 1933, foi mostrada a atividade carcinogênica de um HPA isolado (benzo[a]pireno). Desde então muitos HPA carcinogênicos têm sido descritos (STELLMAN, 1998).

Posteriormente foi comprovado experimentalmente que a presença do benzo[a]pireno, por si só, não justificava toda a atividade carcinogênica observada nestas amostras, sendo

este “excesso de carcinogenicidade”, atribuído à presença conjunta de outros membros da família dos HPA e alguns dos seus derivados, principalmente nitroderivados. Estudos posteriores conduziram à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico, atribuídos a presença destas substâncias (NETTO et al., 2000). Alguns destes processos e misturas são mostrados na TABELA 3, onde a carcinogenicidade para humanos é classificada como classe 1 que corresponde a carcinogênicos, classe 2A para provavelmente carcinogênicos e a classe 2B para possivelmente carcinogênicos (IARC, 2016).

TABELA 3 – EVIDÊNCIAS DE CARCINOGENICIDADE E/OU MUTAGENICIDADE DE ALGUNS PROCESSOS INDUSTRIAIS E MISTURAS COMPLEXAS

<b>Processos/misturas</b>	<b>Evidências epidemiológicas</b>	<b>Evidências experimentais</b>	<b>Classificação pela IARC</b>
Produção de alumínio	Suficientes	-	1
Gaseificação de carvão	Suficientes	-	1
Produção de coque	Suficientes	-	1
Produção de eletrodos de carbono	Suficientes	-	1
Betumes (extratos)	-	Suficientes	2 B
Negro de carvão	Inadequadas	Suficientes	2 B
Exaustão de motores a diesel	Limitadas	Suficientes	2 A
Exaustão de motores a gasolina	Inadequadas	Suficientes	2 B
Óleos minerais (pouco ou não tratados)	Suficientes	Suficientes	1
Óleo de xisto	Suficientes	Suficientes	1
Fuligem	Suficientes	-	1

FONTE: NETTO et al. (2000)

Os diferentes efeitos a curto, médio e longo prazo sobre a saúde humana têm sido o principal impulso para o crescimento do número de pesquisas e consequentes legislações sobre a presença dos HPA em diferentes matrizes. Nos curto e médio prazos as exposições ocupacionais a níveis elevados de misturas de poluentes, contendo HPA são conhecidas por resultar em sintomas como irritação nos olhos, náuseas, vômitos, diarreia, etc. As misturas de HPA são também conhecidas por causar irritações e inflamação da pele (UNWIN et al., 2006).

A carcinogenicidade de certos HPA tem sido bem estabelecida em animais de laboratório, sendo observado um aumento da incidência de câncer de pele, pulmão, bexiga, fígado, e estômago, além de afetar os sistemas hematopoiéticos e imunológicos produzindo problemas reprodutivos, neurológicos, e de desenvolvimento (JONG et al., 1999; LATIF et

al., 2010; SAMANTA et al., 2002, apud KIM et al., 2013). No caso de humanos diretamente, os estudos do Centro dos Estados Unidos para a Saúde Ambiental das Crianças (“United States' Center for Children's Environmental Health”, NCEH) demonstraram que a exposição à poluição de HPA durante a gravidez está relacionada com resultados de partos adversos, incluindo baixo peso ao nascer, parto prematuro, e desenvolvimento retardado da criança (PERERA et al., 2005; KIM et al., 2013). Durante a metabolização dos HPA, a atividade enzimática pode resultar na formação de intermediários reativos que podem formar ligações covalentes com o DNA (RICE et al., 2007). Tem-se demonstrado que os adutos de DNA (um aduto de DNA é uma parte de DNA ligada covalentemente a um composto químico que pode ser causador de carcinogênese), resultam em um espectro de mutações celulares que podem ser teratogênicas, isto é, que afetam o desenvolvimento normal do feto (WELLS et al., 2010).

Os HPA carcinogênicos têm sido a base de muitos estudos de epidemiologia molecular nos casos de populações expostas à poluição ambiental. Na Polônia, por exemplo, as populações expostas à poluição ambiental mostraram aumentos dos níveis de vários marcadores de genotoxicidade, incluindo adutos de DNA de HPA, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (FARMER et al., 2003). Na República Checa, houve um aumento significativo no nível de adutos de DNA de HPA na região poluída. Recém-nascidos com adutos de DNA elevados no sangue do cordão umbilical tiveram ao nascer um comprimento, um peso e um perímetro cefálico significativamente menores em comparação com os recém-nascidos com níveis mais baixos de adutos de DNA no sangue do cordão umbilical. Estes resultados indicam que, pelo menos, em algumas regiões os HPA são uma importante fonte de atividades genotóxicas e embriotóxicas, presentes em misturas orgânicas associadas com a poluição do ar (FARMER et al., 2003). Através de uma investigação sobre os níveis de HPA presentes em placenta, feita com 80 fetos, Ren et al. (2011) demonstrou que o risco de defeitos é de 4 a 5 vezes maior quando os níveis de HPA estão acima de  $597 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios. Nos Estados Unidos e na Polônia, a exposição pré-natal aos HPA foi associada com desenvolvimento cognitivo e inteligência inferiores, bem como problemas de comportamento em crianças mensuradas aos 3 e 7 anos de idade (EDWARDS, et al., 2010, PERERA, et al., 2009, 2006, 2012, 2013, apud GENKINGER, et al., 2015). Tendo um número tão significativo de efeitos provados a curto e médio prazos e dadas as potenciais consequências a longo prazo da exposição aos HPA na faixa etária pré-natal ou

nos primeiros meses de vida, é impossível não salientar a importância da identificação de fatores de risco modificáveis que modulem os efeitos da exposição aos HPA nas suas diferentes matrizes de ocorrência.

Além dos efeitos globalmente observáveis sobre a saúde humana, os diferentes países e no caso do Brasil, as diferentes regiões geográficas têm suas particularidades, incluindo características culturais que podem representar um incremento na exposição aos HPA. Segundo Kamangar (2008), a bebida de erva-mate, feita com as folhas de *Ilex paraguayensis*, conhecida também como chimarrão, tem sido associada a cânceres de esôfago, orofaringe, laringe, pulmões, rins e bexiga. Têm sido encontradas concentrações muito altas de HPA carcinogênicos em folhas de erva-mate, tanto em infusões quentes quanto frias. Esta descoberta apoia a hipótese de que a carcinogenicidade da erva-mate pode estar relacionada com o seu conteúdo de HPA. Assim, um estudo sobre a presença de HPA em diferentes corpos de água doce na Região Sul do Brasil tem um impacto de grande importância para a sua população (IBGE, 2013). Isto aumenta a preocupação pela presença de HPA em corpos de água, devido à possível bioacumulação ocorrida em seres humanos. A análise da presença de HPA em águas dos rios do Paraná é necessária para o estudo dos efeitos na saúde de grandes populações que podem ser afetadas ainda sendo de outros estados e países (PRODUTOS FLORESTAIS, 2013).

## 1.6. LEGISLAÇÃO

Os HPA começaram a ser legislados nos Estados Unidos graças a uma série de negociações na década de 1970, para identificar compostos representativos da poluição produzida pela indústria e assim definir os analitos alvos para as pesquisas de caráter ambiental (ANDERSSON, 2015). Keith e Telliard (1979) apresentaram formalmente a lista de 16 HPA (FIGURA 1) contendo diferentes contaminantes prioritários para a U.S. EPA, documento base para as quatro décadas de pesquisa destes perigosos analitos.

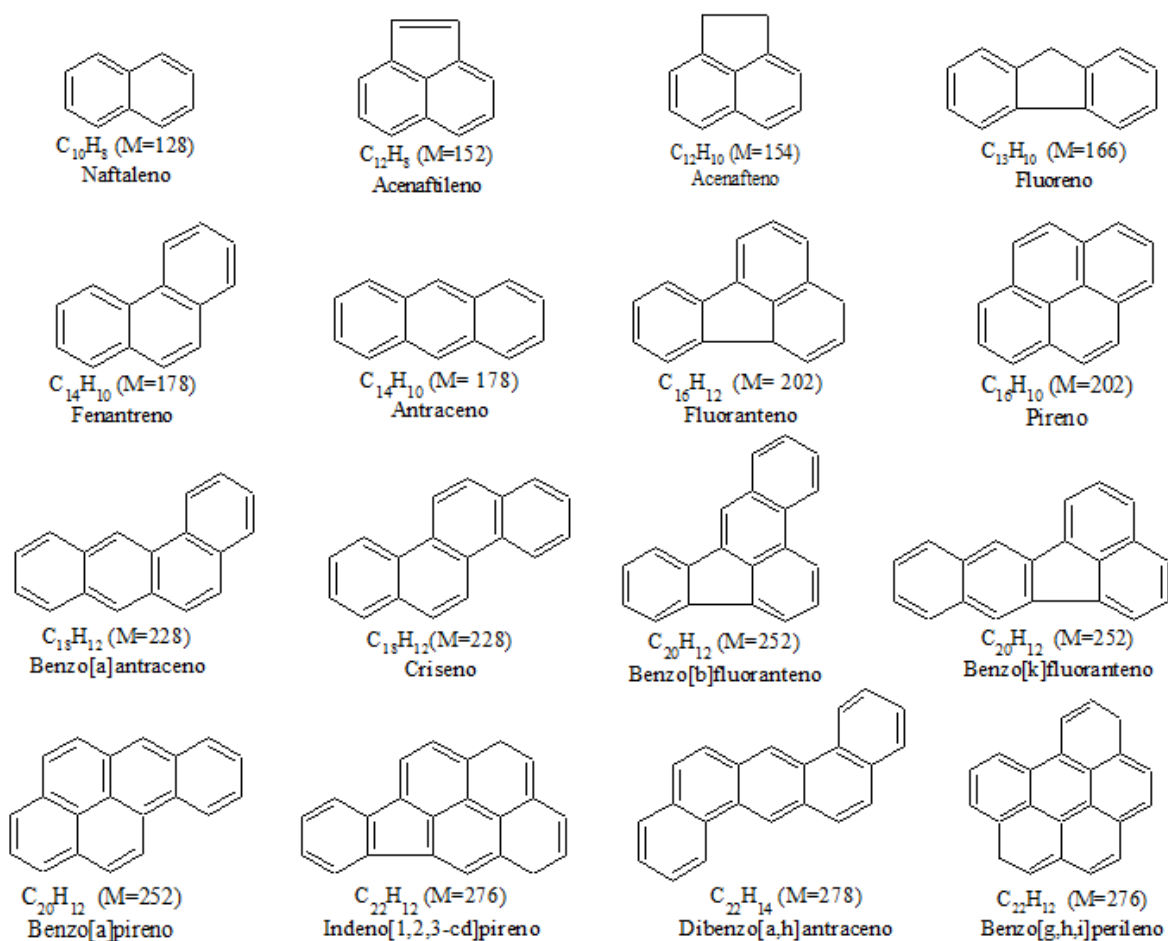


FIGURA 1 – ESTRUTURAS MOLECULARES DOS PRINCIPAIS 16 HPA ESTABELECIDOS PELA U.S. EPA

No Brasil, esses 16 HPA de estudo são classificados como substâncias tóxicas e perigosas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) pela norma ABNT NBR 10.004 vigente desde 2004 até a atualidade. Por sua parte, a Resolução CONAMA n° 357/05 estabelece uma classificação dos corpos de água e os limites na concentração de HPA presentes em cada tipo de corpo aquático. Esta resolução estabelece os limites para a presença de uma série de HPA em águas doces destinadas ao consumo e contato humano (Classe 1) em  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  para os seguintes compostos: benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno.

A classificação dos corpos de água doce segundo CONAMA é a seguinte:

- **Classe especial:** águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
- **Classe 1:** águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
- **Classe 2:** águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e à aquicultura e à atividade de pesca.
- **Classe 3:** águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais.
- **Classe 4:** águas que podem ser destinadas à navegação; e à harmonia paisagística.

A TABELA 4, apresenta os limites máximos da concentração de alguns HPA estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05 em corpos d'água doce.

TABELA 4 – LIMITES MÁXIMOS DA CONCENTRAÇÃO DE ALGUNS HPA EM DIFERENTES CLASSES DE ÁGUA SEGUNDO A LEGISLAÇÃO FEDERAL BRASILEIRA

Corpo d'água doce	Concentrações máximas permitidas de HPA em águas doces ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	Benzo[a] antraceno	Benzo[a] pireno	Benzo[b] fluoranteno	Benzo[k] fluoranteno	Criseno	Dibenzo[a,h] antraceno	Indeno [1,2,3-cd] pireno
Classe 1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Classe 1*	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
Classe 3	-	0,7	-	-	-	-	-

\*Padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo

### 1.7. BIODGRADAÇÃO DOS HPA

Os riscos associados aos HPA podem ser superados através da utilização de métodos convencionais, que envolvem remoção, alteração, ou o isolamento do poluente. Tais técnicas envolvem escavação de solos contaminados e sua incineração ou contenção, tecnologias geralmente caras, e nas quais frequentemente há uma transferência de poluentes de uma fase para outra. Por outro lado, a biorremediação é a ferramenta para transformar os compostos em formas menos perigosas ou não perigosas com menor utilização de produtos químicos, energia e tempo (HARITASH et al., 2009). A degradação dos HPA envolve a quebra de compostos orgânicos através de biotransformação em metabólitos menos complexos, e por meio de mineralização em minerais inorgânicos,  $H_2O$ ,  $CO_2$  (aeróbica) ou  $CH_4$  (anaeróbica). No entanto, a biorremediação de um poluente e sua taxa dependem das condições do meio, o número e tipo de microrganismos, a natureza química e estrutura do composto químico a ser degradada. As bactérias são a classe de microrganismos ativamente envolvidas na degradação de poluentes orgânicos em locais contaminados (como no caso de descarga de resíduos petroquímicos a longo prazo), portanto um número de espécies de bactérias é conhecido por degradar HPA. Diferentes estudos têm demonstrado que as bactérias podem degradar o benzo[a]pireno (o mais cancerígeno e tóxico dos presentes em resíduos petroquímicos) quando cultivadas em uma fonte alternativa de carbono em experimentos de cultura líquida (HARITASH et al., 2009).

Por outro lado, vários fungos são conhecidos pela sua propriedade de degradação de poluentes persistentes. A degradação microbiana por fungos ligninolíticos produz enzimas ligninolíticas extracelulares com muito baixa especificidade do substrato, tornando-os adequados para a degradação de compostos diferentes (HARITASH et al., 2009). Experimentos com enzimas purificadas revelaram que as enzimas ligninolíticas são capazes de degradar os HPA, por exemplo, Handibarata et al. (2013) revelou uma degradação de até 92% da concentração do antraceno após 30 dias de incubação na caracterização de metabólitos de antraceno produzidos por *Armillaria sp. F022* em um sistema enzimático. A degradação dos HPA requer um consórcio de microrganismos, onde as algas são mais uma opção. Cianobactérias, algas verdes e diatomáceas são conhecidas por metabolizar o naftaleno a uma série de metabólitos. Assim, o benzo[a]pireno é transformado em dióis e quinonas por algas marinhas em um período de 5 a 6 dias (HARITASH et al., 2009).



A biodegradação de HPA tem sido observada em condições aeróbias e anaeróbias, porém a biodegradação anaeróbica de HPA é um processo lento, iniciado através da introdução de ambos átomos de oxigênio molecular no núcleo aromático, sendo a reação catalisada por uma dioxigenase de multicomponentes, que consiste em uma redutase, uma ferredoxina e uma proteína de ferro-enzofre (HARAYAMA et al., 1992, apud HARITASH et al., 2009). Grande parte dos estudos metabólicos recentes se focalizam nas *sphingomonadas* e actinobactérias, especialmente na sua capacidade para atacar compostos de massa molecular elevada ( $MM \geq 202$ ). As actinobactérias, com suas taxas de crescimento lentas e sua capacidade de se aderir a superfícies hidrofóbicas, são altamente adaptadas a substratos de massa molecular elevada com baixa biodisponibilidade (KANALY, 2010). Kweon et al., (2010) demonstrou que uma série de enzimas evoluíram para acomodar especificamente os HPA de alta massa molecular nos seus grandes bolsos de ligação de substrato nos seus locais ativos e assim, as enzimas satisfazem os requisitos espaciais para a sua dihidroxilação eficiente (VILA, 2015). O tratamento de HPA tem gerado comunidades microbianas com grandes capacidades de degradação de HPA, como por exemplo a degradação de naftaleno, fenantreno, antraceno e pireno pela *Alteromonas sp. SN2*, segundo reportado por Jin et al. (2012). Contudo, os HPA de maior massa molecular persistem devido à maior dificuldade para degradar-se, já os mais leves são tratados por diversos métodos. Por exemplo Wang et al. (2007), reportou uma remoção de até 93% do total de HPA utilizando um sistema de tratamento de águas residuais composto por unidades anóxicas e aeróbicas na China, mas os HPA de mais de 3 anéis de benzeno permaneceram quase inalterados. No entanto, microrganismos com capacidade para degradar os HPA de maior massa molecular, através de co-metabolismos com amostras preparadas em laboratórios, têm sido estudados com sucesso para HPA de massa molecular elevada como o benzo[a]pireno (MOODY et al., 2004, RENTZ et al., 2005).

## 1.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTAIS

A determinação de HPA em amostras ambientais requer procedimentos de amplo cuidado analítico, devido às baixas concentrações destes contaminantes presentes em amostras de grande complexidade. Consequentemente, os métodos analíticos devem incluir técnicas de separação e detecção para amostras multicomponentes com uma ampla variedade

de polaridades, volatilidades, tamanhos e formas moleculares (POSTER et al., 2006). As separações cromatográficas para a análise de HPA, baseadas na distribuição entre a fase estacionária e a fase móvel presentes na coluna cromatográfica, desempenham um papel fundamental na determinação de HPA em amostras ambientais. Algumas das técnicas de separação cromatográfica mais utilizadas são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (“*High Performance Liquid Chromatography*”, HPLC) e a Cromatografia Gasosa (“*Gas Chromatography*”, GC). Na atualidade são utilizadas alterações dessas técnicas, como apresenta a TABELA 5. Um caso relevante é a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (“*Ultra Performance Liquid Chromatography*”, UPLC), a qual apresenta limites de detecção baixos e similares à GC. Abaixo, são listados os métodos estabelecidos pela U.S.EPA para a determinação de HPA:

TABELA 5 – MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS SEGUNDO U.S.EPA

Método	Foco do método	Título	Referência
525.2	Organic compounds by liquid-solid extraction and capillary column GC-MS	Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water-Supplement III	EPA/600/R-95-131
550 550.1	PAHs by liquid-liquid extraction and HPLC with coupled UV and FL detection	Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water Supplement I	EPA/600/4-90/020
610	Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater	Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants	EPA, 610, 2005
625	Methods for the organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater	Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants	EPA, 625, 2005
1625	Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater	Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants	EPA, 1625, 2005

#### 1.8.1. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é um processo de separação de substâncias químicas, baseada na diferença de distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária, para separar os componentes de uma amostra. Aquelas substâncias distribuídas preferencialmente na fase móvel, passam através do sistema cromatográfico mais rápido do que as que possuem maior afinidade com a fase estacionária. Assim, as substâncias são eluídas a partir da coluna na

ordem inversa da magnitude dos coeficientes de distribuição, com respeito aqueles da fase estacionária (SCOTT, 1998).

Devido a sua simplicidade, sensibilidade e efetividade na separação de compostos, é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis na atualidade. Em curto período de tempo tornou-se a principal técnica para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis (PENTEADO et al., 2008).

### 1.8.2. Princípio

As separações cromatográficas gasosas podem se classificar de acordo com a natureza física da fase estacionária em cromatografia gás-sólido (*Gas-Solid Chromatography, GSC*) e cromatografia gás-líquido (*Gas-Liquid Chromatography, GLC*).

Um diagrama representando um cromatógrafo a gás básico apresenta-se na FIGURA 2. Os principais componentes de um cromatógrafo a gás são: cilindro de gás, injetor, coluna, forno, detector, sistema de controle e aquisição de dados.

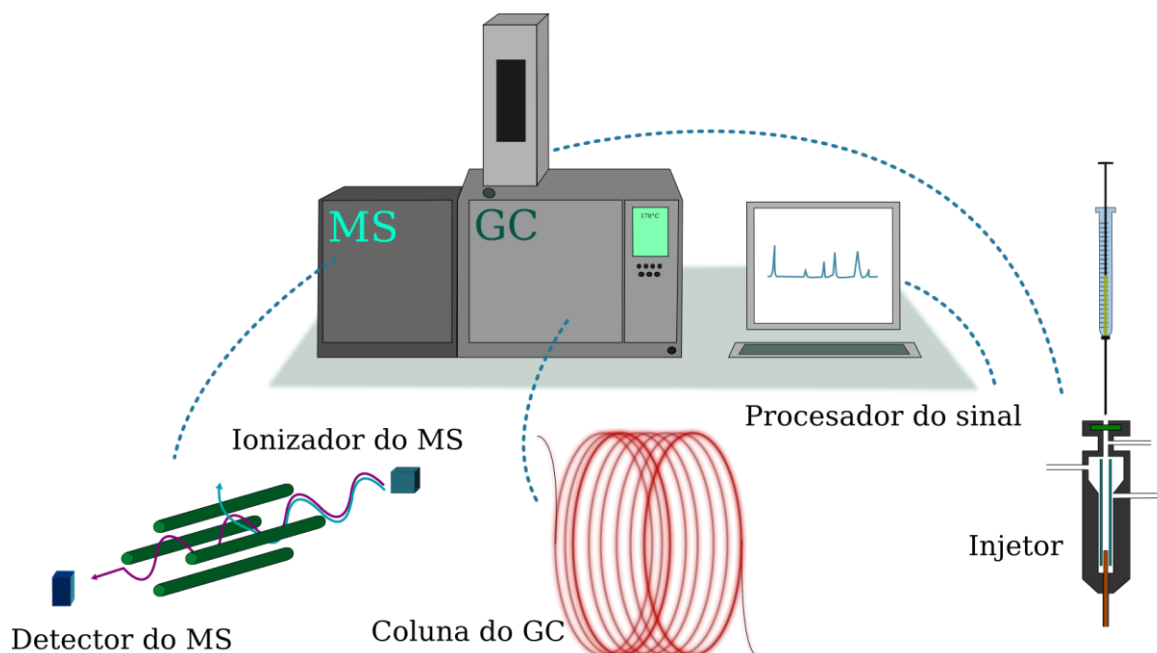


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMATÓGRAFO A GÁS  
FONTE: A AUTORA

Em cromatografia gasosa a fase móvel é um gás inerte, usualmente hélio, hidrogênio ou nitrogênio, e a fase estacionária é um líquido de alta massa molecular, o qual é depositado na superfície na forma de partículas finamente divididas ou nas paredes de uma coluna tubular. O fluxo de gás através do dispositivo de injeção com temperatura determinada é controlado por válvulas de medição de gás. A coluna é conectada ao sistema de injeção e as amostras são introduzidas (com o auxílio de uma micro seringa), onde é vaporizada e transferida junto com o gás de arraste para a coluna cromatográfica, dentro de um forno com taxa de aquecimento estabelecida. Um detector conectado direto à coluna monitora a eluição individual dos compostos. O detector deve ser inerte ao gás quando os compostos eluídos estão sendo detectados. O registro da resposta com o tempo forma o cromatograma.

#### 1.8.2.1. Detecção por espectrometria de massas

O equipamento utilizado no presente trabalho faz uso de um espectrômetro de massas com quadrupolos tridimensionais do tipo armadilha de íons para a detecção seletiva dos HPA, o qual está disposto em seguida ao cromatógrafo a gás. O espectrômetro está conformado por um eletrodo anelar, que substitui dois eletrodos retos do sistema convencional de quadrupolo linear, mais dois eletrodos hiperbólicos.

No seu funcionamento, os elétrons que provêm da fonte de ionização passam por um dos eletrodos hiperbólicos, enquanto o segundo deste tipo permite que os íons passem através de orifícios na sua parte central para atingir o detector. O espectrômetro coleta as moléculas da amostra diretamente da coluna cromatográfica em fase gasosa, arrastadas pelo fluxo de gás (He) da coluna cromatográfica. Estas entram na armadilha de íons e recebem um bombardeio de elétrons emitidos na fonte de elétrons e energizados a 70eV, os quais são direcionados para a região central da armadilha. Esta energia não é só suficiente para ionizar as moléculas, mas também as fragmenta, sendo os padrões de fragmentação dos íons a determinada energia característicos das moléculas ionizadas (MCMASTER, 2008).

A ionização por elétrons demora o tempo suficiente para produzir o número de íons pré-selecionados, num intervalo de 100  $\mu$ s de pré-ionização, conhecido como “controle automático de ganho”. Os íons formados neste processo produzem uma resposta que é utilizada como escala de tempo de ionização para produzir o número procurado de íons ao longo da ionização analítica. O potencial de aprisionamento no interior da armadilha

influencia os íons formados com uma frequência fixa no eletrodo anel, assim, todos íons num intervalo de razão massa carga ( $m/z$ ) são aprisionados dentro do campo de quadrupolo estabelecido (LEITE, 2008).

Durante e após a ionização, os íons sofrem aproximadamente 20.000 colisões por segundo com os átomos de hélio até se fragmentar em íons característicos de razões  $m/z$ . Os íons não perdidos se focalizam para o centro da armadilha, e mediante uma frequência aplicada no eletrodo central, acontece uma ejeção seletiva das massas iônicas, levando os íons ejetados através dos orifícios dos eletrodos hiperbólicos. Dessa forma, a metade dos íons atravessa um dos eletrodos hiperbólicos, atingindo o multiplicador de elétrons. Os sinais iônicos detectados geram o espectro de massas em ordem crescente de razão  $m/z$ , cujas intensidades são diretamente proporcionais as suas abundâncias (LEITE, 2008).

### 1.9. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE HPA

O preparo de amostra em cromatografia, como passo prévio à introdução da amostra no sistema cromatográfico, constitui um aspecto de grande transcendência. Este processo compreende um conjunto de operações orientadas a evitar as dificuldades derivadas da complexidade da matriz e da excessiva diluição da amostra. Geralmente são procedimentos físicos e físico-químicos nos quais é frequente o emprego de duas fases para levar a cabo uma separação global com ou sem pré-concentração. Os processos mais comuns são de sorção (troca iônica, adsorção com carvão ativado, sílica, alumina, etc), partição (com fases ligadas suportadas, etc), extração líquido-líquido, destilação ou volatilização, ultracentrifugação, osmose inversa, liofilização, entre outras (VALCÁRCEL et al., 1988).

O desenvolvimento de técnicas analíticas de preparo de amostra para determinar o transporte e destino de poluentes no ambiente, geralmente utiliza água ultrapura com soluções padrão em concentrações maiores àquelas encontradas nos corpos d'água natural. No caso dos HPA mais hidrofóbicos, estas concentrações estão próximas às suas solubilidades, e quando a concentração do soluto está próxima à sua solubilidade, ocorre o processo físico-químico da formação de coloides, a qual pode gerar erros sistemáticos nas técnicas analíticas mencionadas, segundo Li et al. (2001). Em consequência, deve-se manter um controle estrito sobre a concentração do soluto para evitar este fenômeno e garantir uma solução consideravelmente efetiva, quando for este o objetivo.

Cabe destacar que a estabilidade dos coloides liofílicos, como os de HPA, é altamente sensível à temperatura (com menor temperatura, menor estabilidade) e às pequenas quantidades de eletrólitos inorgânicos. Este último fator é devido a que tais eletrólitos provocam um desequilíbrio nas forças eletrostáticas de atração e repulsão de Van der Waals entre as partículas destes coloides, cujas distâncias entre partículas são consideravelmente maiores do que aquelas dos coloides convencionais. Desta maneira, uma elevada temperatura e agitação, junto com a presença de eletrólitos inorgânicos, favorecem o processo de diluição dos HPA, isto é, a desestabilização dos seus coloides. A existência de coloides de HPA em águas naturais é pouco provável, devido tanto aos longos tempos necessários para alcançar o equilíbrio quanto à influência de eletrólitos inorgânicos (LI et al., 2001). No entanto, quando empregadas soluções de água natural enriquecidas com HPA, suas concentrações ficam mais próximas às correspondentes à solubilidade dos HPA com maior massa molecular, podendo introduzir erros na extração destes analitos.

Há uma grande quantidade de técnicas de extração usadas para extrair poluentes orgânicos a partir de matrizes líquidas e sólidas. Considerando que as concentrações totais de HPA em águas naturais são baixas chegando a nível de  $50 \text{ ng L}^{-1}$  para locais não poluídos e de até  $6 \text{ g L}^{-1}$  nos rios mais contaminados (SANTANA-ROMERO et al., 2012), é necessário desenvolver técnicas seletivas e sensíveis, como a etapa de preparo de amostra, para a determinação desses compostos no ambiente. Neste sentido, a extração é um processo vital para sua determinação, e, portanto, tem sido o foco de uma grande quantidade de pesquisas. Usualmente a Extração em Fase Sólida (“*Solid Phase Extraction*”, SPE) e a Extração Líquido-Líquido (“*Liquid-Liquid Extraction*”, LLE) são o ponto de partida para o desenvolvimento de técnicas mais eficientes. Em ambos os casos os analitos são extraídos a partir de uma solução aquosa e posteriormente dissolvidos em um solvente orgânico, o qual é evaporado para concentrar os analitos a serem detectados. Estas duas técnicas requerem tempo e esforço considerável, e no caso da SPE, que apresenta a vantagem de poder ser automatizada, tem também as inconveniências de necessitar de solventes tóxicos para a etapa de eluição, e de descartar seus cartuchos após seu uso, fato que incrementa seu custo econômico e volume de resíduos perigosos (COELHO et al., 2008).

Recentemente foram aplicadas uma série de técnicas de extração para HPA em matrizes de aquosas a partir da SPE e a LLE, como por exemplo no caso da Micro Extração em Fase Sólida (“*Solid Phase Micro Extraction*”, SPME), versão miniaturizada que reduz os tempos de extração e o uso de solventes como reportado por Coelho et al. (2008). Uma miniaturização que vai além da SPME, é a Nano Extração em Fase Sólida (“*Solid Phase Nano Extraction*”, SPNE), técnica modificada por Wilson (2014) para fazer uso de nano partículas de ouro para a extração dos HPA, mediante a centrifugação das partículas sobrenatantes no meio aquoso e com solventes para a extração dos analitos. Esta técnica apresentou um uso ainda menor de solventes do que a SPME, um objetivo em comum com o presente trabalho.

Por outro lado, a Micro Extração Dispersiva Líquido-Líquido (“*Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*”, DLLME), desenvolvida por Rezaee et al. (2006), se baseia na injeção de uma mistura de solvente extrator e solvente dispersivo na amostra aquosa e os analitos são extraídos nas gotículas finas do solvente extrator, que é separado e analisado. Algumas modificações têm sido feitas com o intuito de otimização como realizado por Tseng et al. (2014), utilizando-se a emulsificação num dos seus métodos (“*Up-and-down Shaker-assisted Dispersive Liquid-liquid Microextraction*”, UDSA-DLLME), e substituindo o solvente orgânico com uma solução surfactante em outro (“*Water with Low Concentration of Surfactant in Dispersed Solvent-assisted Emulsion Dispersive Liquid-liquid Microextraction*”, WLSEME). Ambas as técnicas apresentam bons limites de detecção e boas recuperações (TABELA 6).

Outra modificação às técnicas clássicas, é a Extração Sortiva de Imersão Direta e em “Headspace” (“*Direct Immersion and Headspace Sorptive Extraction*”, DIHS), combinação simultânea apresentada por Triñanes et al. (2015). Esta configuração foi desenvolvida para extrair tanto os HPA de menores massas moleculares quanto aqueles de maiores massas, sendo uma proposta para resolver um problema comum entre as técnicas de extração para estes analitos: condições diferentes e muitas vezes antagônicas entre tais grupos de massa molecular.

Na TABELA 6, estão apresentadas estas e outras técnicas que representam uma referência importante para medir a eficiência da HF-LPME com os desenvolvimentos contemporâneos.

TABELA 6 – TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE HPA EM ÁGUAS NATURAIS

Analito	Técnica de extração	Técnica analítica	LOD	Recuperação	Referência
16 HPA	DIHS-SE	UPLC-FD-UV	0,001-17 $\mu\text{gL}^{-1}$	46-103%	Triñanes et al. (2015)
11 HPA	UDSA-DLLME	GC-MS	0,022-0,06 $\mu\text{gL}^{-1}$	84-113%	Tseng et al. (2014)
11 HPA	WLSEME	GC-MS	0,022-0,13 $\mu\text{gL}^{-1}$	86-114%	Tseng et al. (2014)
16 HPA	SPNE	GC-MS	4,94-65,5 $\text{ngL}^{-1}$	23-116%	Wilson et al. (2014)
8 HPA	Nano conducting copolymer coated frits – SPE	HPLC-UV	0,01-0,08 $\text{ngmL}^{-1}$	64-119%	Rahimi et al. (2014)
13 HPA	IL-MNPs-SPE	GC-MS	0,04-1,11 $\mu\text{gL}^{-1}$	75-102%	Galán-Cano et al. (2013)
8 HPA	MEPS	GC-MS	0,8-8,2 $\text{ngL}^{-1}$	70-117%	Fu et al. (2012)
10 HPA	Monolithic capillary SPE	GC-MS	2,8-11,5 $\text{ngL}^{-1}$	57-99%	Galán-Cano et al. (2011)
15 HPA	SBSE	GCxGC-TOF-MS	0,01-2,5 $\text{ngL}^{-1}$	> 70%	Gómez et al. (2011)
16 HPA	MWCNTs- SPE	GC-MS	0,001-0,15 $\mu\text{gL}^{-1}$	72-93%	Wu et al. (2010)
16 HPA	SPME	GC-FID	0,06-0,50 $\mu\text{gL}^{-1}$	> 71%	Coelho et al. (2008)
16 HPA	MASE	LVI-GC-MS	3-40 $\text{ngL}^{-1}$	72%-114%	Rodil et al. (2007)
16 HPA	SPME	GC-MS	1 – 29 $\text{ngL}^{-1}$	-	King et al. (2004)
16 HPA	SPE	HPLC	0,01 – 5 $\text{ngL}^{-1}$	28,3-104,3%	Kabziński et al. (2002)

#### 1.9.1. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME)

Os avanços e descobertas em desenhos moleculares de materiais e fabricação de membranas têm sido muito importantes para a expansão das tecnologias em processos de separação moderna. As extrações baseadas em membranas têm aumentado nos últimos anos, encontrando diferentes aplicações nos campos biomédicos, ambientais, alimentícios e na indústria (DA LA GUARDIA et al., 2011).

Em geral, as membranas podem ser consideradas como barreiras seletivas entre duas fases: fase doadora e fase receptora. Existem dois tipos básicos de membranas: membranas por exclusão de tamanho e membranas de extração. No primeiro tipo, a separação ocorre pelo



efeito de peneira, procurando minimizar as interações químicas entre a membrana e os analitos; no segundo tipo, a interação entre a membrana e os analitos fornece uma seletividade química. As membranas de extração podem ser classificadas de acordo com sua morfologia (quantidade, tamanho e distribuição dos poros através da estrutura) como: membranas micro porosas seletivas e membranas homogêneas de extração (não porosas). Com exceção das membranas denominadas poliméricas (não porosas) as membranas de extração são polímeros orgânicos sintéticos hidrofóbicos, os quais se tornam não porosos quando um solvente orgânico preenche seus poros. Dentro dos polímeros usados com maior frequência na sua fabricação se encontram o polipropileno (PP), o politetrafluoretileno (PTFE) e o polifluoreto de vinilideno (PVDF) (DA LA GUARDIA *et al.*, 2011).

Duas configurações básicas de membranas de extração podem ser usadas: as membranas planas (*flat sheet*) e as fibras ocas (*Hollow fibers*). A primeira configuração requer a implementação de um dispositivo de extração para suportar a membrana (usualmente colocada no meio dos dispositivos) enquanto que a fibra oca tem forma capilar e pode ser auto suportada (DA LA GUARDIA *et al.*, 2011). A primeira membrana polimérica de fibra oca foi patenteada como um dispositivo de separação por Mahon e o grupo Dow Chemical em 1966, e após um tempo foi comercializado pela Dow, Monsanto e Du Pont, entre outros (HIDAL *et al.*, 2015, BAKER, 2012). Comparada com as membranas planas, a configuração da fibra oca oferece uma série de vantagens devido às suas características de módulo e desenho, tais como: (1) uma área maior de membrana por unidade de volume nos módulos de membrana; (2) auto suporte mecânico para suportar uma lavagem para a separação líquida e (3) facilidade na manipulação durante a fabricação do módulo e o processo de operação. Na atualidade as membranas de fibra oca são amplamente empregadas como alternativas às separações tradicionais em um grande espectro de aplicações relativas à energia, produção de água, meio ambiente e ciências da saúde (HIDAL *et al.*, 2015).

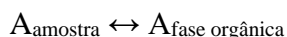
A microextração em fase líquida suportada com fibra oca, termos comumente utilizados em português (*"Hollow fiber liquid phase microextraction"*, HF-PLME) foi introduzida pela primeira vez em 1999 por Pedersen e Einar (PEDERSEN *et al.*, 1999), para a análise de meta-anfetamina em amostras de plasma e urina de seres humanos. Nesta técnica, uma fibra oca porosa, geralmente de polipropileno, é preenchida com um pequeno volume (microlitros) de solução receptora imiscível em água. A fibra oca preenchida é imersa no solvente orgânico,

por poucos segundos, para imobilizar o solvente, antes de ser colocado na solução aquosa doadora (amostra) onde a extração ocorre. Os analitos são extraídos a partir da solução aquosa por meio da membrana líquida suportada (“*Supported Liquid Membrane*”, SLM) ou *lumen* da fibra, sob agitação, migrando para a solução receptora. Após o tempo de extração, a solução receptora é retirada da fibra oca com auxílio de uma micro seringa e transferida à análise cromatográfica (GHAMBARIAN et al., 2012).

A HF-LPME não é uma técnica exaustiva como a LLE ou a SPE, isto significa que a fase receptora não é capaz de extrair uma grande quantidade do composto presente na fase doadora, devido a que esta é significativamente menor à fase doadora ou porque a transferência de massa é muito lenta. Os métodos não exaustivos são usualmente mais rápidos do que os exaustivos, já que não é necessário alcançar o equilíbrio de partição (ROSTAGNO et al., 2013). Esta técnica de extração pode ser utilizada no modo de duas ou três fases, dependendo da natureza do analito a ser extraído e do solvente a ser utilizado. No presente trabalho é utilizado o modo de duas fases devido ao caráter hidrofóbico dos compostos, cuja solubilidade é maior em solventes orgânicos (imiscíveis em água) do que em meio aquoso.

#### 1.9.1.1. Configuração de duas fases para HF-LPME

No sistema de duas fases, os analitos são extraídos a partir de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico (fase receptora), o qual encontra-se imobilizado nos poros e no interior dessa membrana (fase extratora). O extrato final obtido é diretamente compatível com GC, sendo o tolueno e o 1-octanol os solventes mais utilizados com GC e HF-LPME de duas fases (GHAMBARIAN et al., 2012). Este processo é representado pelo equilíbrio abaixo:



onde A representa a concentração do analito de interesse.

O coeficiente de partição entre a solução orgânica receptora e a solução aquosa doadora  $K_{\frac{r}{d}}$  é definido conforme a equação 1:

$$K_{\frac{r}{d}} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} \quad (1)$$

onde  $C_{eq,r}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora e  $C_{eq,d}$  é a concentração do analito no equilíbrio na solução doadora (PEDERSEN et al., 2008). A quantidade de analito  $n_i$  é igual à soma das quantidades individuais de analito presente nas duas fases durante todo o processo de extração:

$$n_i = n_d + n_r \quad (2)$$

onde  $n_d$  corresponde à quantidade de analito presente na fase doadora e  $n_r$  a quantidade de analito presente na fase receptora. No equilíbrio a equação (2) pode ser escrita da seguinte forma:

$$C_i V_d = C_{eq,d} V_d + C_{eq,r} V_r \quad (3)$$

onde  $C_i$  é a concentração inicial do analito na amostra e  $V_d$  e  $V_r$  são os volumes da fase doadora e da fase receptora, respectivamente. No equilíbrio, segundo Pedersen et al. (2008), a quantidade de analito extraído para a fase extratora  $n_{eq,r}$  do sistema pode ser expressa da seguinte maneira:

$$n_{eq,r} = \frac{K_{r/d} V_r C_i V_d}{K_{r/d} V_r + V_d} \quad (4)$$

A eficiência da extração, também chamada de recuperação, é definida como:

$$R = \frac{n_{eq,r}}{n_{total}} \quad (5)$$

onde  $n_{eq,r}$  e  $n_{total}$  são os números de moles extraídos e totais de A, respectivamente. De acordo com a equação (1) e o equilíbrio de massas do sistema de extração de duas fases HF-LPME, a eficiência de extração pode ser calculada da seguinte forma:

$$R = \frac{100 n_{eq,r}}{C_i V_d} = \frac{K_{r,d} V_r}{K_{r,d} V_r + V_d} \times 100 \quad (6)$$

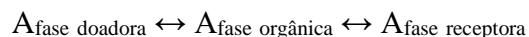
O fator de enriquecimento do analito pode ser calculado pela equação (7),

$$E = \frac{C_r}{C_i} = \frac{V_d R}{100 V_r} \quad (7)$$

onde  $C_r$  é a concentração de A na fase receptora ao final da extração (GHAMBARIAN et al., 2012). A partir dessas equações pode-se supor que a recuperação é dependente do coeficiente de partição e dos volumes da fase doadora e da fase receptora, sendo que no caso do sistema com duas fases a fração do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana da fibra oca não está disponível para sua posterior análise; apenas a fração presente no interior pode ser retirado para um micro inserto (TUNG SI HO et al., 2002).

#### 1.9.1.2. Configuração de três fases para HF-LPME

No sistema de três fases a membrana da fibra oca é utilizada para separar três fases líquidas. Os analitos de interesse são extraídos a partir de uma solução aquosa (fase doadora), através de uma camada fina de solvente orgânico (na ordem de microlitros) imobilizado nos poros de uma fibra oca (fase orgânica) para outra solução aquosa, no interior da fibra oca (fase receptora). Neste caso o solvente orgânico serve como uma barreira entre a solução receptora e doadora, prevenindo a mistura entre as duas fases (PSILLAKIS et al., 2003). Este processo pode ser ilustrado pelo seguinte equilíbrio:



A técnica de três fases envolve ambos coeficientes de partição (entre a fase orgânica e a fase doadora e entre a fase receptora a fase orgânica), definido pelas equações (8) e (9):

$$K_{\text{org,d}} = \frac{C_{\text{eq,org}}}{C_{\text{eq,d}}} \quad (8)$$

$$K_{\text{r,org}} = \frac{C_{\text{eq,r}}}{C_{\text{eq,org}}} \quad (9)$$

onde  $C_{eq,org}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na fase orgânica,  $C_{eq,d}$  a concentração do analito no equilíbrio na solução doadora e  $C_{eq,r}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora. O coeficiente de partição entre a fase doadora e a fase receptora, produto de  $K_{org,d}$  e  $K_{r,org}$  encontra-se representada pela seguinte equação:

$$K_{\frac{r}{d}} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} = K_{org,d} \cdot K_{r,org} \quad (10)$$

Desta forma, no sistema de três fases a quantidade de analito inicial é igual à soma das quantidades de analito individuais presentes nas três fases durante todo o processo de extração:

$$n_i = n_d + n_{org} + n_r \quad (11)$$

sendo  $n_d$  a quantidade de analito presente na fase doadora (amostra aquosa),  $n_{org}$  o analito presente na fase orgânica e  $n_r$  a quantidade de analito presente na fase receptora em qualquer ponto da extração. No equilíbrio, a equação (11) pode ser expressa como:

$$C_i V_d = C_{eq,d} V_d + C_{eq,org} V_{org} + C_{eq,r} V_r \quad (12)$$

onde  $C_i$  é a concentração inicial na amostra,  $C_{eq,d}$ ,  $C_{eq,org}$  e  $C_{eq,r}$  são as concentrações na fase doadora, na fase orgânica e na fase receptora no equilíbrio, respectivamente. Por outro lado,  $V_d$ ,  $V_{org}$  e  $V_r$  são os volumes da amostra (fase doadora), fase orgânica e fase receptora, respectivamente.

A quantidade de analito extraída na fase receptora pode ser calculada substituindo  $K_{r/d}$   $C_{eq,d}$  pelo termo  $C_{eq,a}$  e rearranjo da equação (11). No equilíbrio a quantidade de analito presente na fase receptora,  $n_{eq,r}$ , pode ser calculada pela equação (13):

$$n_{eq,r} = \frac{K_{\frac{r}{d}} V_r C_i V_d}{K_{\frac{r}{d}} V_r + K_{org,d} V_{org} + V_d} \quad (13)$$

A recuperação pode ser expressa como:

$$R = \frac{100n_{eq,r}}{C_i V_d} = \frac{100K_r V_r}{K_r/d V_r + K_{org}/d V_{org} + V_d} \quad (14)$$

O fator de enriquecimento pode ser calculado pela equação (15) (TUNG SI HO et al., 2002):

$$E = \frac{C_r}{C_i} = \frac{V_d R}{100 V_a} \quad (15)$$

No caso do sistema de três fases, todo o volume da fase receptora encontra-se disponível para sua posterior análise, contrário ao sistema de duas fases.

#### 1.10. PLANEJAMENTO FATORIAL

A otimização com designs experimentais, como o planejamento fatorial, apresenta diversas vantagens frente à otimização de uma variável por vez (univariado) que consiste em fixar todas as variáveis do sistema, a exceção de uma, com alguns valores de partida, selecionados em função dos conhecimentos do pesquisador a respeito do sistema, ou, às vezes, baseados à sua intuição. Uma vez definidos esses valores, é realizado um experimento alterando o valor da variável em estudo para posteriormente selecionar o valor que produza o melhor resultado. Esta operação é repetida com todas as variáveis, até que o processo de busca proporcione um resultado ótimo (CESPÓN, 2008).

O consumo de tempo e dinheiro, assim como falsas suposições do comportamento das variáveis no sistema, são os principais inconvenientes deste tipo de otimização. Deste modo, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se pela interação simultânea das variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais.

Entende-se por planejamento fatorial qualquer pesquisa de todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores em cada ensaio. Defina-se fator como cada variável do sistema em estudo e nível como as condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos, geralmente identificados por nível baixo (-) e nível alto (+) (MONTGOMERY, 2004).

Em um planejamento fatorial o efeito define-se como a mudança na resposta produzida pela mudança do nível baixo (-) para o nível alto (+) do fator. Com frequência chama-se de efeito principal porque se refere aos fatores de interesse primários do experimento.

Quando o planejamento é de  $k$  fatores e cada um com dois níveis, podendo ser níveis quantitativos ou qualitativos, o planejamento fatorial consiste de  $2^k$  experimentos. Este planejamento é de grande utilidade nas etapas iniciais de trabalho experimental, quando se estudam muitos fatores e proporciona o menor número de corridas com as quais podem se estudar  $k$  fatores em um planejamento fatorial completo (MONTGOMERY, 2004).

Para o planejamento fatorial de três fatores, suponha-se A, B e C, cada um com dois níveis. Isto significa que há  $2 \times 2 \times 2 = 8$  combinações possíveis de níveis de fatores. Utiliza-se a notação “+” e “-” para representar os níveis alto e baixo dos fatores, respectivamente, como se mostra na TABELA 7. A terceira coluna utiliza uma notação para descrever as combinações, o número (1) se usa para indicar que todos os fatores estão no nível baixo (MILLER et al., 2002).

TABELA 7 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$

Experimento	Fator			Combinação	Resposta
	A	B	C		
1	-	-	-	(1)	$y_1$
2	+	-	-	a	$y_2$
3	-	+	-	b	$y_3$
4	+	+	-	c	$y_4$
5	-	-	+	bc	$y_5$
6	+	-	+	ac	$y_6$
7	-	+	+	ab	$y_7$
8	+	+	+	abc	$y_8$

Há sete graus de liberdade entre as oito combinações de tratamento, três graus de liberdade se associam com os efeitos principais de A, B e C, e quatro graus de liberdade se associam com as interações AB, AC, BC e ABC. A estimativa do efeito principal de cada fator é, por definição, a média dos efeitos entre seus dois níveis superior e inferior (NETO et al., 2010). Assim, o efeito principal do fator A corresponde à diferença entre a média das

quatro corridas no nível alto ( $\bar{y}_A^+$ ) e a média das quatro corridas no nível baixo ( $\bar{y}_A^-$ ). De igual forma, o efeito principal dos fatores B e C são definidos como a média dos efeitos entre seus dois níveis. Estes resultados são apresentados na TABELA 8 (MONTGOMERY, 2004).

TABELA 8 – EFEITOS PRINCIPAIS DOS FATORES A, B, C

Efeitos Principais	Equação
A	$A = \bar{y}_{A^+} - \bar{y}_{A^-}$ $A = \frac{1}{4n} (a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc)$
B	$B = \bar{y}_{B^+} - \bar{y}_{B^-}$ $B = \frac{1}{4n} (b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac)$
C	$C = \bar{y}_{C^+} - \bar{y}_{C^-}$ $C = \frac{1}{4n} (c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab)$

Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra, como neste caso, diz-se que as duas variáveis interagem e, portanto, pode se calcular o efeito de interação entre elas. Deste modo, o efeito de interação AB, BC, AC e ABC é definido como a diferença entre a média do nível superior (+) e a média no nível inferior (–):

TABELA 9 – EFEITOS DE INTERAÇÃO DOS FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Efeitos Principais	Equação
AB	$AB = \frac{1}{4n} (abc - bc + ab - b - ac + c - a + (1))$
AC	$AC = \frac{1}{4n} ((1) - a + b - ab - c + ac - bc + abc)$
BC	$BC = \frac{1}{4n} ((1) + a - b - ab - c - ac + bc + abc)$
ABC	$ABC = \frac{1}{4n} (abc - bc - ac + c - ab + b + a - (1))$

Supondo que o experimento foi realizado em duplicatas pode se estimar o erro experimental e a partir de aí avaliar a significância estadística dos efeitos. Para calcular a estimativa conjunta da variância de uma observação individual, considera-se (NETO et al., 2010):

$$\hat{V}(y) = s^2 = \sum \frac{d_{i2}}{2N} \quad (16)$$



onde  $d$ , é a diferença entre as duas observações correspondentes ao  $i$ -ésimo ensaio. Esta expressão também pode ser posta na forma de um produto escalar. Chamando de  $d$  o vetor coluna das diferenças entre os ensaios, podemos escrever:

$$s^2 = \frac{d^t d}{2N} \quad (17)$$

Tirando a raiz quadrada desse valor, obtemos uma estimativa do desvio padrão associado a uma observação, também chamado erro-padrão de um efeito:

$$s = \sqrt{\frac{d^t d}{2N}} \quad (18)$$

Com isto, são considerados estatisticamente significativos os efeitos cujas estimativas forem superiores em valor absoluto ao produto do erro-padrão pelo ponto da distribuição de *Student* (NETO et al., 2010).

### 1.11. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Devido ao constante estudo de compostos de interesse nas distintas amostras e à implementação de novas tecnologias é necessário o desenvolvimento de novos métodos de análise. Independente de se tratar de um aperfeiçoamento de um método já existente ou do desenvolvimento de um novo, o método deverá ser validado para que este possa atender as exigências das aplicações analíticas, em termos de confiabilidade dos resultados (DA SILVA, 2011).

Segundo a IUPAC, em um método de validação, as características quantitativas de interesse estão relacionadas com a exatidão dos resultados. Portanto, pode se afirmar que a validação do método é o mesmo que a estimação da incerteza de medição (KEBBEKUS et al., 1998).

Diversos órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA e INMETRO, definem protocolos ou guias para a validação de métodos analíticos como requisitos para assegurar a qualidade em laboratórios de ensaio. No Brasil, há duas agências que regulamentam a validação de métodos analíticos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO

(Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). (RIBANI et al., 2004). O presente trabalho pretende reunir os princípios científicos essenciais dos documentos de acordo com a Resolução ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003 e a IUPAC (Pure Appl. Chem., 2002) com o objetivo de serem aplicados aos resultados obtidos.

De tal modo, as características de desempenho a serem avaliadas neste trabalho, também chamadas de parâmetros de desempenho ou, às vezes, como figuras analíticas de mérito são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (RIBANI et al., 2004).

#### 1.11.1. Parâmetros Analíticos de Mérito

##### 1.11.1.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004).

Em métodos cromatográficos, a seletividade é obtida através da avaliação com detectores (arranjo de diodos, espectrômetro de massas) de modo a comparar o espectro do pico de interesse com o de um padrão como indicação da pureza do pico cromatográfico e, portanto, da atribuição de somente um composto (ANVISA, 2003).

##### 1.11.1.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação. As diretrizes da ICH e da ANVISA recomendam que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo cinco níveis de concentração, entretanto a IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração (RIBANI et al, 2004).

Os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, quanto mais próximo de um, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação

recomendado pela ANVISA é de 0,99, entretanto o INMETRO recomenda um coeficiente de 0,90 (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

A quantificação dos compostos de interesse pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição de padrão (RIBANI et al., 2004). Para efeitos desta dissertação será empregado o método de padronização interna, o qual consiste na adição de uma quantidade conhecida e constante de padrão interno às soluções padrão com a intenção de diminuir os erros aleatórios e sistemáticos, por exemplo erros instrumentais. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz e não fazer parte da amostra. Após a análise constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno) com a razão das concentrações (concentração da substância/ concentração do padrão interno). A amostra também é determinada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma e a concentração conhecida do padrão interno tem-se a concentração da substância na amostra. (RIBANI et al., 2004). Para a amostra a relação entre o sinal ( $Sinal_M$ ) e a concentração ( $C_M$ ) vem dada pela seguinte equação:

$$Sinal_M = k_M \cdot C_M \quad (19)$$

Similarmente para o padrão interno tem-se:

$$Sinal_{P.I.} = k_{P.I.} \cdot C_{P.I.} \quad (20)$$

Arranjando as duas equações anteriores têm-se:

$$\frac{Sinal_M}{Sinal_{P.I.}} = f \cdot \frac{C_M}{C_{P.I.}} \quad (21)$$

onde  $f$  corresponde ao fator de resposta  $f = k_M/k_{P.I.}$  que deve ser constante em um determinado intervalo de concentrações. Este fator é diretamente o valor da inclinação da

curva quando forem plotadas as relações das áreas e das concentrações. Finalmente a equação para calcular a concentração do composto de interesse na amostra é (HARRIS, 2006):

$$C_M = \left( \frac{S_{\text{inalM}}}{S_{\text{inalP.I.}}} \right) \times \left( \frac{C_{\text{P.I.}}}{f} \right) \quad (22)$$

#### 1.11.1.3. Precisão

A precisão é definida como a proximidade ou concordância dos resultados obtidos a partir de um conjunto de medidas repetidas de uma mesma amostra, sob condições definidas. A precisão está intimamente relacionada com a presença de erros indeterminados (ou aleatórios) sendo avaliada pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ) segundo a equação (23), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Porém, na prática em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão relativo % DPR ou coeficiente de variação (% CV) segundo a equação (24) (RIBANI et al., 2004).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (23)$$

$$CV = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \times 100 \quad (24)$$

A precisão é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade (precisão intra-corrida); precisão intermédia (precisão inter-corrida) e reprodutibilidade. Para o estudo de validação deste trabalho serão avaliadas a precisão intra-corrida e a precisão inter-corrida, pois a reprodutibilidade refere-se a estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Portanto, os resultados obtidos das medições de uma mesma amostra são efetuados sob condições variadas (analistas e/ou equipamentos diferentes). Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um DPR de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DPR de até 30% (para concentrações de até 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dependendo da complexidade da amostra de acordo com a AOAC International (TAVERNIERS et al., 2004).

#### 1.11.1.3.1. Repetitividade (precisão intra-corrida)

A repetitividade é a concordância entre os resultados de medições repetidas em uma sucessão rápida (em um mesmo dia), efetuadas sob as mesmas condições de medição, isto é: mesmo método, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo local sob as mesmas condições. A repetitividade é também chamada de precisão intra-corrida ou intra-ensaio e pode ser verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com 3 três réplicas cada ou um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (RIBANI et al., 2004).

#### 1.11.1.3.2. Precisão Intermediária (precisão inter-corrida)

Indica a concordância dos resultados dentro do laboratório obtidos sob as mesmas condições, mas efetuadas em dias e/ou analistas e/ou equipamentos diferentes. O número de ensaios necessários obedece à mesma recomendação da ANVISA para o cálculo da repetitividade, por tanto pode ser avaliada em três concentrações (com três réplicas) em dois dias distintos (RIBANI et al., 2004).

#### 1.11.1.4. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência (RIBANI et al., 2004). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada (ANVISA, 2003).

A EPA recomenda que a exatidão seja fornecida como a diferença entre o valor predito e o valor considerado verdadeiro, enquanto a ANVISA recomenda que este parâmetro seja estimado como a razão destas duas concentrações, expresso nas equações (25) e (26), respectivamente (ALVES et al., 2008).

$$\text{Exatidão} = \left( \frac{x_i - x_v}{x_v} \right) \times 100 \quad (25)$$

$$\text{Exatidão} = \left( \frac{x_i}{x_v} \right) \times 100 \quad (26)$$

onde  $x_i$  é o valor inicial e  $x_v$  o valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão. Neste trabalho a exatidão é avaliada com ensaios de recuperação.

#### 1.11.1.4.1. Ensaios de Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação),  $R$ , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004). A informação de recuperação pode ser estimada a partir de um composto substituto cujo comportamento seja representativo ao de interesse. Os compostos substitutos, adicionados nas amostras, podem ser de vários tipos:

- Padrão da substância adicionado à matriz isenta da substância ou à amostra (fortificação, incorporação, dopagem, enriquecimento, termos provenientes do inglês “spiking”);

- Padrão interno, sendo uma versão da substância modificada isotopicamente e composto quimicamente diferente da substância de interesse, mas representativo de seu comportamento.

É importante mencionar que na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises em nível de resíduos, o GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação (ANVISA, 2003). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços geralmente são estabelecidos entre 40 e 120%, para concentrações de até  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (TAVERNIERS et al., 2004).

#### 1.11.1.5. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) é definido como a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental, enquanto o limite de quantificação (LOQ) é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método. Existem três formas de estimar os LOD e os LOQ: método visual; método de relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (ALVES et al., 2008). Neste trabalho será utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica pois apresenta maior confiabilidade estatística, levando em consideração o intervalo de confiança da regressão. O LOD neste caso é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 99% ou 95% de confiança, segundo a equação (27) (RIBANI et al., 2004).

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (27)$$

onde  $\sigma$  é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear (obtido no presente trabalho através de uma triplicata) e  $S$  é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular, ambos da curva analítica. Os mesmos critérios podem ser adotados pelo LOQ, utilizando uma relação 10:1 (RIBANI et al., 2004).

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (28)$$

#### 1.12.1. Área de estudo: Bacia Hidrográfica do Alto Iguaçu

Para o presente estudo foram escolhidos três pontos, cada um pertencente a um rio diferente, mas todos eles formam parte da Bacia Hidrográfica do Iguaçu. O primeiro ponto foi o Rio Belém, no Município de Curitiba; o segundo no Rio Iguaçu no Município de São José dos Pinhais; e o terceiro ponto foi no Rio Irai no Município de Pinhais.

O rio Belém tem sido historicamente poluído. Já no ano de 1721 o Ouvidor Raphael Pardini obrigou à população a limpar o Rio Belém (SAWCZUK et al., 2013), e mais tarde, no ano 1888 reportou-se a primeira epidemia (febre tifoide) relacionada com as condições deste rio. Nos anos subsequentes o enorme crescimento populacional tem produzido

diferentes iniciativas para proteger e tratar a crescente contaminação da bacia do rio Belém. Esta bacia é a segunda maior de Curitiba com 87,80 km<sup>2</sup>, equivalente a 20,32% da área total da cidade, abastecendo aproximadamente 34% da população (COHAB, 2007). Este rio de 17,13 Km nasce e acaba dentro da cidade, os limites da sua bacia correspondem aos primeiros caminhos das tropas do passado, e atualmente são alguns dos principais caminhos da cidade. O rio percorre vários bairros da cidade de norte a sul, e deságua no rio Iguaçu, no bairro Boqueirão, onde está sua Estação de Tratamento de Esgoto, a mais utilizada do Município, pois atinge a totalidade dos seus 840 L de capacidade (SUDERHSA, 1998).

Segundo as classificações da Resolução CONAMA n° 357/05 e a Portaria SUREHMA 20/92, as águas do rio Belém são consideradas como Classe 2 e 3. Segundo SUDERHSA (1998), 90% das águas do rio descrito devem sua poluição à descarga de dejetos domésticos, enquanto nos restantes 10% aos efluentes industriais.

O Rio Iguaçu (“água grande” na língua Guarani) é um dos mais importantes do Estado do Paraná, com suas águas correndo para o interior de leste a oeste. Nasce na Região Metropolitana de Curitiba, cruza o estado de leste a oeste e representa um recurso muito importante para o desenvolvimento agropecuário, industrial e urbanístico para o Estado. Sua bacia atinge os estados Paraná e Santa Catarina (Brasil), e Misiones (Argentina), contendo um grande número de reservas ecológicas, incluindo o Parque Nacional do Iguaçu, reconhecido pela UNESCO como Patrimônio Natural da Humanidade (SEMA, 2010). Sendo um dos maiores rios do sul do continente, com 18579 Km<sup>2</sup> de maciço área florestal e considerado a veia que alimenta o agronegócio paranaense (COHAB, 2007), o Rio Iguaçu, na sua Área de Proteção Ambiental, é por exemplo, vítima da extração de areia e argila coincidente, pois estas atividades se caracterizam pela geração de passivos ambientais. Estas e outras fontes de contaminação fazem com que suas águas sejam definidas como classe 2 segundo a resolução CONAMA n° 357/05 (SUREHMA, 1992).

O Rio Irai, formado pelos rios Canguiri, Cercado, Curralinho e Timbu, deve seu reconhecimento principalmente à sua represa, o Reservatório Irai construído no ano 2000. Este abrange os municípios paranaenses de Pinhais, Piraquara e Quatro Barras, suprimindo com sua capacidade de 58.000.000 m<sup>3</sup> cerca de 40% da demanda hídrica de Curitiba. O Reservatório Irai, com 15 Km<sup>2</sup> de superfície e 163 Km<sup>2</sup> de área de drenagem, apresenta uma enorme predominância de cianobactérias (LAGOS, 2009), particularidade que poderia



influenciar sua capacidade para a biodegradação de HPA. Sobre sua ocupação, Andreoli et al. (1999) reporta por exemplo que no Rio Curralinho, um dos que formam o Rio Irai, apresenta trabalho de mineração, provocando uma ocupação desordenada, enquanto que na bacia do Capivari, as atividades industriais estimulam ocupações próximas às cabeceiras do Irai. Já a Colônia Faria, tradicionalmente sem uso intensivo nem agrotóxicos, é a principal exploração agrícola da bacia. Como resultado, as águas deste rio que se origina junto com o rio Atuba (COHAB, 2007), são classificadas como classe 2 segundo a resolução mencionada.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto de pesquisa consiste em otimizar um método de extração para determinar a presença e concentração dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários em águas doces superficiais empregando cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O objetivo geral é composto pelos seguintes objetivos específicos:

- i. Determinar e otimizar as condições cromatográficas para a separação e quantificação dos HPA em amostras de água doce superficial;
- ii. Desenvolver e otimizar um método de extração baseado na técnica de microextração em fase líquida com membrana suportada (HF-LPME) para amostras de água doce superficial;
- iii. Validar a metodologia analítica para determinar HPA em água mediante a técnica de microextração em fase líquida com membrana suportada (HF-LPME);
- iv. Identificar e determinar as concentrações de HPA presentes em amostras de água de rio, através da aplicação do método otimizado;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Química Ambiental (LabQAM) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.1. INSTRUMENTOS

As análises cromatográficas foram efetuadas em um cromatógrafo a gás (Thermo Electron Corporation) com espectrômetro de massas modelo Focus-PolarisQ, acoplado a um autoamostrador AS 3000 (Thermo Electron Corporation) com um sistema de armadilha de íons, e um cromatógrafo a gás GC2010 com espectrômetro de massas modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation), acoplado a um autoamostrador AOC-5000. A separação dos analitos foi executada com uma coluna capilar não polar modelo DB-5MS (Agilent Technologies, INC.) e uma coluna de baixa polaridade e baixo sangramento SH-Rtx™-5MS (Shimadzu Corporation), para o primeiro e segundo equipamento respectivamente (com um comprimento de 30 m, um diâmetro interno de 0,25 mm e uma espessura de filme de 0,25 µm). Os limites de temperatura para o desempenho das colunas encontram-se entre os valores de 60°C e 325 °C. Para a técnica de HF-LPME uma seringa de 50 µL (modelo 710 N9) da Hamilton (Nevada, USA) com dimensões de 51 mm x 0,15 mm x 0,72 mm (comprimento x diâmetro interno x diâmetro externo) foi necessária para o suporte e retirada do solvente orgânico e uma seringa médica (diâmetro interno de 0,7 mm x 50 mm) para suportar a fibra. Um agitador magnético com placa de aquecimento de vitrocerâmica marca IKA (modelo C-MAG HS7) com indicação de velocidade por escala de 100 – 1500 rpm. As pesagens do cloreto de sódio foram realizadas em uma balança (Mettler Toledo) modelo XS205DU com uma capacidade de 220 g e uma resolução de 0,01mg/0,1 mg. Para o processo de secagem do solvente orgânico da HF-LPME foi empregado um concentrador rotativo a vácuo (modelo RVC 2-18CD) com velocidade de 1500 rpm e regulação de temperatura de 5 a 40 °C. A filtração da água dos rios foi efetuada com uma bomba a vácuo (modelo TE-0581) marca Tecnal. Finalmente as medições de pH e condutividade da água foram efetuadas com um pHmetro (modelo 5-Star Plus) da Thermo Scientific Orion e um condutivímetro da marca Digimed (DM-31).

### 3.2. REAGENTES E MATERIAIS

O diclorometano (99,9%) e a acetona (99,9%) foram adquiridos da Dielab, o metanol (99,9%) da J.T. Baker e o tolueno (99,9%) da Sigma-Aldrich®. Todos os reagentes empregados para o preparo das soluções padrão foram de grau HPLC para a determinação de concentrações traço, portanto foram utilizados sem purificação adicional. A água empregada durante o procedimento de limpeza e preparo de soluções foi obtida mediante o sistema de purificação de água (marca Millipore Simplicity UV). Foi utilizado o gás de hélio como gás de arrastre em GC-MS e o gás de nitrogênio para a etapa de secagem das amostras extraídas, ambos com 99,9999% de pureza, adquiridos da White Martins (São Paulo, Brasil). Fibras ocas de polipropileno (Q3/2 Accurel KM) de membrana GmbH foram adquiridas da Wuppertal, Alemanha com um diâmetro interno de 600 µm, uma espessura de parede de 200 µm e um tamanho de poro de 0,2 µm. Para a coleta de amostras de rio foram utilizados frascos de vidro borossilicato âmbar de 1 L e finalmente para sua filtragem se utilizaram as seguintes membranas na ordem respectiva: membrana de celulose de 28 µm de porosidade (JP41) da marca J.Prolab, de 2 µm de porosidade (tipo 50) da marca INLAB e membranas de acetato de celulose lisa de 0,47 µm (code 516.047) da marca Unifil.

### 3.3. LIMPEZA DE VIDRARIA

Todas as vidrarias volumétricas utilizadas foram submetidas a um procedimento de limpeza, seguindo as seguintes etapas: molho em banho detergente (Extran® 5% v/v) por 24 horas, enxágues com água corrente, água destilada (5 alíquotas), água ultrapura (5 alíquotas) e acetona (5 alíquotas). Para a limpeza das vidrarias não volumétricas foi seguido o mesmo procedimento com a diferença da calcinação em mufla durante 4 horas a 400 °C, depois da secagem completa. Para o caso dos *vials* e insertos o procedimento de limpeza incluiu o uso do *ultrassom* para cada etapa descrita previamente. Antes de cada processo de extração foi necessária a descontaminação das seringas, para isso foram lavadas 10 vezes com acetona e 10 vezes com tolueno.

### 3.4. PADRÕES E SOLUÇÕES

Os padrões dos HPA assim como seus padrões internos e subrogado foram adquiridos da AccuStandard (USA), contidos todos eles na forma de ampolas separadas. Os padrões dos HPA estão na forma de uma solução-padrão contendo os 16 compostos de estudo principal (acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno e pireno) na concentração de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em diclorometano:benzeno (1:1) (v/v). A solução dos padrões internos contém os 5 HPA deuterados (acenafteno- $\text{d}_{10}$ , criseno- $\text{d}_{12}$ , fenantreno- $\text{d}_{10}$ , naftaleno- $\text{d}_8$  e perileno- $\text{d}_{12}$ ) na concentração de  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em diclorometano. Por último, a solução padrão do subrogado contendo p-terfenil- $\text{d}_{14}$  em diclorometano, apresenta uma concentração analítica de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 3.5. PREPARO DE AMOSTRA

A partir da solução estoque de HPA e subrogado, cuja concentração era de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparada uma solução de  $80 \text{ mg L}^{-1}$  em um balão de 25 mL. A solução estoque dos padrões internos foi preparada a partir de uma concentração inicial de  $4000 \text{ mg L}^{-1}$  para obter uma concentração final de  $160 \text{ mg L}^{-1}$  em um balão de 25 mL. Posteriormente foram preparadas uma série de soluções intermediárias para atingir as seguintes concentrações:  $992 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $9,92 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dos HPA;  $4960 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $99,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dos padrões internos e finalmente  $5,12 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $256 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão subrogado. Todas estas soluções foram preparadas em diclorometano, armazenadas em frascos âmbar e guardadas no *freezer*. A partir destas últimas, foram preparadas uma série de soluções de trabalho pela adição de alíquotas de uma solução padrão para o desenvolvimento das diferentes etapas, as quais envolvem: a estimação das condições do método cromatográfico, o estudo de otimização da técnica HF-LPME, a validação do método e a fortificação das amostras ambientais. Para o caso da otimização cromatográfica e da curva analítica as amostras foram preparadas em diclorometano direto no *vial*, antes da injeção para evitar perdas por volatilização. No caso da otimização da HF-LPME foi utilizado o tolueno como solvente e água ultrapura (Mili-Q).

### 3.6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O desenvolvimento do método cromatográfico para a determinação dos 16 HPA foi realizado por GC-MS baseado no método estabelecido por Ferreira (2010), mediante a otimização das condições cromatográficas. Para isso, foram utilizadas diversas rampas de aquecimento a fim de obter uma resolução cromatográfica satisfatória e uma boa separação simultânea dos analitos de interesse. Para o estudo de otimização foram utilizadas soluções mistas dos 16 HPA, 5 deuterados e o subrogado em diclorometano (métodos A e C) e em tolueno (métodos B e D), a partir das soluções padrão intermediárias, variando as concentrações de 200 a 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para ambos os equipamentos utilizados, a energia de colisão foi de 70 eV, com taxa de varredura de 0,5 scan  $\text{s}^{-1}$ . O injetor foi operado a 270 °C e a linha de transferência a 230 °C no modo sem divisão da amostra (*Splitless*). O volume de injeção foi de 1  $\mu\text{L}$ . A obtenção dos sinais foi primeiramente realizada no modo de varredura completa (*Full scan*) com uma faixa de aquisição de massas de  $m/z$  50 a 500 a uma taxa de 1 scan  $\text{s}^{-1}$ . A avaliação do comportamento cromatográfico dos compostos foi realizada através do estudo dos cromatogramas gerados pelos softwares correspondentes, nos quais foi consultada a biblioteca de espectros NIST (*National Institute of Standard Technology*, 2005 e 2010), para a identificação de cada analito por meio da comparação dos íons de quantificação e de confirmação, já estabelecidos na literatura para cada um dos compostos. A TABELA 10 apresenta os íons de quantificação e de confirmação dos HPA e padrões internos segundo o método 8270 C da U.S. EPA (1996).

Os métodos A e B foram otimizados partindo-se das condições utilizadas por Ferreira (2010), empregando o diclorometano e o tolueno como solventes, respectivamente. Por outro lado, os métodos C e D foram otimizados a partir dos métodos A e B, respectivamente.

Para os métodos C e D foi utilizado o modo de monitoramento seletivo de íons (*"Selective/single ion monitoring"*, SIM) por meio do estudo prévio das três razões massa/carga ( $m/z$ ) obtidas dos seus respectivos íons moleculares (geralmente o íon de quantificação) e íons de fragmentação (dois íons de confirmação). As programações de temperatura e outras condições cromatográficas dos métodos desenvolvidos estão apresentadas na TABELA 11.



### 3.7. TESTES PRELIMINARES DOS PARÂMETROS PRINCIPAIS DA HF-LPME

Como etapa prévia à otimização foram efetuados diversos experimentos dos parâmetros que afetam diretamente o procedimento de extração, com o objetivo de definir os aspectos práticos mais relevantes da técnica de HF-LPME. Deste modo, foram avaliadas duas configurações: uma configuração em “U” que utiliza duas micro seringas conectadas à fibra e a outra configuração em forma de “haste”, valendo-se do auxílio de uma micro seringa para a injeção e coleta da fase receptora (FIGURA 3) (MOARES et al., 2008). Para ambas configurações se utilizou ciclohexano, hexano e tolueno como possíveis solventes receptores. Além disso, foram feitos testes da razão das fases receptora e doadora, estudando o comprimento da fibra oca a 5 e 10 cm em uma solução aquosa de 10 e 20 mL. Para este propósito foi avaliado um parâmetro por vez, deixando os outros fixos com valores intermediários dentro da faixa de trabalho estudada, baseando-se em valores já estabelecidos na literatura.

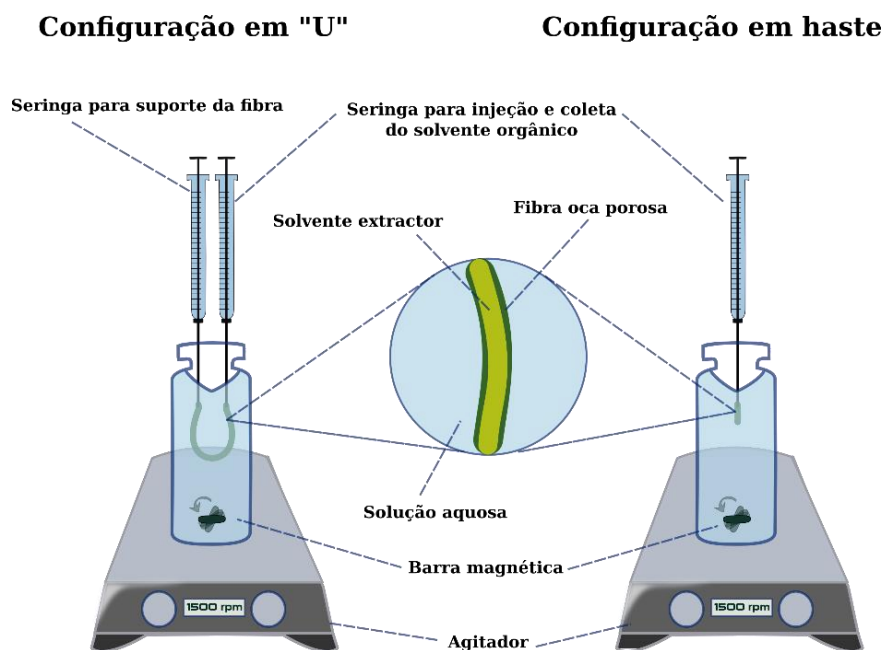


FIGURA 3 – CONFIGURAÇÃO EM FORMA DE “U” E EM FORMA DE “HASTE” PARA HF-LPME.

FONTE: A AUTORA.



### 3.8. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR HF-LPME

Previamente à extração, as fibras ocas foram cortadas em segmentos de 5 e 10 cm de comprimento e submetidas a um processo de limpeza com ultrassom em acetona por 10 min, deixando-as ao ar livre para sua completa secagem. Após a secagem, uma das extremidades da fibra foi fixada na ponta de uma micro seringa de 100  $\mu\text{L}$ , contendo um volume conhecido de tolueno (solvente extrator) e a outra extremidade foi fixada na ponta de uma seringa médica, no caso da configuração na forma de “U”, cuja única função foi servir de suporte para evitar a perda do solvente durante a extração. A seguir, um volume conhecido de tolueno foi passado através da fibra, para preencher o interior da membrana e imersa neste solvente por 10 segundos com o intuito de impregnar e abrir os poros da fibra. Após isso, a configuração, seja na forma de “U” ou na forma de “haste”, foi colocada na solução aquosa, contendo o cosolvente, os analitos e o sal para a extração sob constante agitação. Depois do tempo e agitação estabelecidos, a solução receptora é retirada da fibra com a microseringa, mantendo a fibra dentro da solução doadora para evitar a volatilização do tolueno. Um volume aproximado de 14  $\mu\text{L}$  da solução extraída foi transferido a um inserto de 200  $\mu\text{L}$  e seco com um fluxo de nitrogênio. Posteriormente a sua secagem foi adicionada uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de padrão interno em diclorometano (atingindo uma concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para sua posterior injeção de 1  $\mu\text{L}$  no GC-MS. Uma fibra oca nova foi usada para cada extração. A seguir, representa-se o procedimento de extração na Figura:

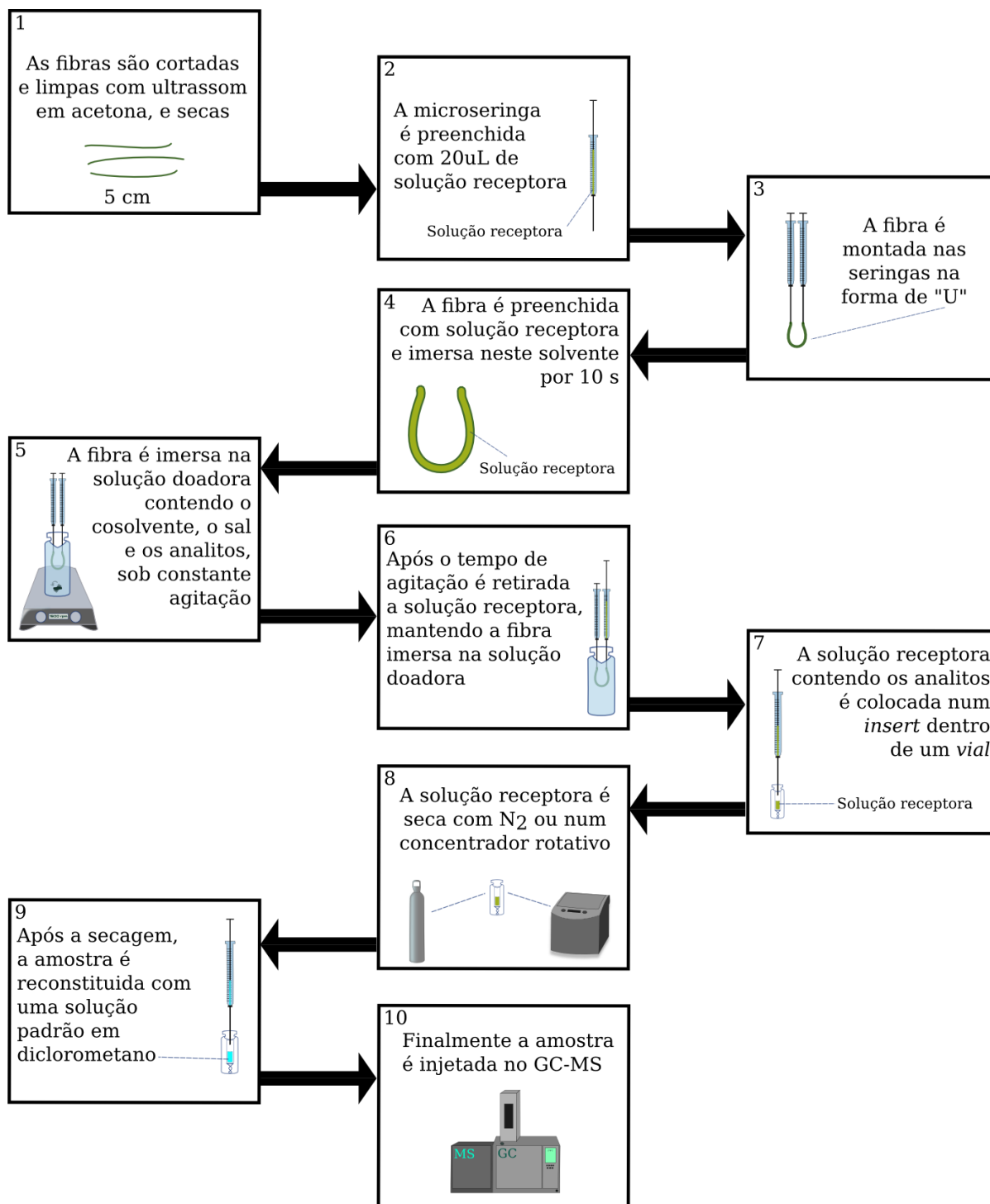


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE HF-LPME  
FONTE: A AUTORA

### 3.9. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA HF-LPME

Uma vez estabelecidos os parâmetros relativos à extração, foi necessário estudar as possíveis variáveis que interferem na transferência de massa devido a HF-LPME ser um processo baseado na distribuição do equilíbrio. Considerando que, a transferência de massa para a fase receptora é um processo dependente do tempo de extração e da agitação para alcançar o equilíbrio é importante sua avaliação. Assim, foram escolhidos três níveis de velocidade de agitação (660, 940 e 1500 rpm) em virtude do intervalo de velocidades fornecidas pelo equipamento em si, podendo avaliar ao mesmo tempo dois extremos de agitação. Também foram realizados experimentos com três valores de tempo, sendo de 10, 15 e 20 minutos. Para o efeito de *salting-out* foram testadas três porcentagens de cloreto de sódio agregando diferentes quantidades do sal em 20 mL para atingir 2,5 %, 5 % e 10 %. Outro fator que foi estudado foi a adição de um cosolvente na solução aquosa para promover a difusão dos HPA à fase extratora pois a baixa solubilidade dos HPA em água, mesmo nos compostos com menor massa molecular, impede a completa difusão desde a fase doadora para a fase receptora. Deste modo foram estudadas soluções de água:acetona, água:metanol e acetona:metanol a 20% (% v/v).

Desta maneira, foram feitos dois planejamentos fatoriais, um  $2^3$  e um  $2^2$ , com triplicata no ponto central, com o intuito de otimizar as condições que afetam a eficiência da extração dos analitos, conforme mostram as TABELAS 12 e 13. Após a determinação da melhor combinação de fatores principais no planejamento  $2^3$ , foi executado o planejamento  $2^2$  para definir a concentração do cosolvente e o tempo de extração. Para ambos os planejamentos, foram utilizadas amostras de água ultrapura enriquecidas com os 16 HPA para obter concentrações finais de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os padrões internos deuterados não foram utilizados para a otimização da técnica HF-LPME, em razão de que estes são colocados antes da injeção, sem passar pelo processo de extração. Os parâmetros não avaliados, tais como o pH, foram estabelecidos sob critérios técnicos estudados a partir dos testes preliminares, cujo valor encontrou-se na faixa de 7,42 a 7,97. Os gráficos de Pareto foram obtidos através do programa *Statistica 7.0* (Stat Soft, Inc., Estados Unidos, 2004).

TABELA 12 – PLANEJAMENTO 2<sup>3</sup> PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME

Parâmetro	Fator	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Velocidade (rpm)	V	660	940	1500
Cosolvente 20% (%v/v)	C <sub>o</sub>	Acetona	Acetona: Metanol	Metanol
Concentração NaCl (%m/v)	C	2,5	5	10

Experimento	Parâmetros		
	V	C <sub>o</sub>	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Fibra oca de polipropileno, pH 7,50, 25 °C, 20 mL de solução aquosa, 5 cm de comprimento de fibra (14,13 µL) e 15 minutos de tempo de extração.

O volume do extrator foi calculado pela equação do cilindro:  $V = \Pi \cdot r^2 \cdot h$  com “r” como o raio e “h” como o comprimento da fibra oca.

Os zeros representam os experimentos realizados em triplicata no Nível (0)

TABELA 13 – PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup> PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME

Parâmetro	Fator	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Concentração de Acetona (%v/v)	C	10	15	20
Tempo de extração (min)	t	10	15	20

Experimentos	Parâmetros	
	C	t
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fibra oca de polipropileno, pH 7,50, 25 °C, 20 mL de solução aquosa e 5 cm de comprimento de fibra (14,13 µL).

O volume do extrator foi calculado pela equação do cilindro:  $V = \Pi \cdot r^2 \cdot h$  com “r” como o raio e “h” como o comprimento da fibra oca.

Os zeros representam os experimentos realizados em triplicata no Nível (0)

### 3.10. COLETA E PREPARO DE AMOSTRA DE RIO

Devido a que o alvo do trabalho consistiu na determinação de contaminantes presentes em concentrações consideravelmente baixas, as amostras de corpos d'água natural devem ser coletadas com particular atenção. Desta forma, as amostras foram coletadas utilizando um balde metálico e frascos de vidro de borossilicato para evitar a fotodegradação dos analitos (ROLLA et al, 2009). Com o intuito de garantir a pureza da amostra, a coleta foi realizada segurando o frasco pelo fundo para evitar contaminações na coleta o mais longe possível das águas estagnadas em cada caso, como é sugerido pela NBR 9898 (ABNT, 1987) e pela U.S. EPA (2000). Evitou-se a presença de qualquer corpo estranho no frasco, durante a coleta, para evitar além de contaminações, variações no volume coletado (PARRON et al., 2011). Já coletadas, as amostras foram rotuladas e transportadas para o laboratório num recipiente termicamente isolado em menos de 24 horas, e posteriormente armazenadas a aproximadamente 4°C no *freezer*, como recomendado para compostos orgânicos (DUNCAN et al., 2007).

As amostras (1L) foram filtradas por meio de uma bomba a vácuo, usando membranas de celulose de 28,0 µm de porosidade, e posteriormente foram empregados filtros de membranas hidrofílicas constituídas de ésteres de celulose de 0,47 µm de porosidade, como indicado por Parron et al. (2011). No caso da amostra correspondente ao ponto 3 foi necessário a utilização de uma membrana de 2,0 µm após a primeira filtração por causa da maior quantidade de matéria particulada. De acordo com as recomendações da U.S.EPA (2000) todas as amostras foram extraídas em um período máximo de uma semana para garantir a não degradação dos HPA. As especificações dos pontos de coleta dos rios Belém, Iguaçu e Irai, são apresentadas na TABELA 14.

TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DA COLETA DE ÁGUA DE RIO

Ponto	Rio	Município	Coordenadas
1	Belém	Curitiba	25°28'38.2"S 49°14'29.2"W
2	Iguaçu	São José dos Pinhais	25°31'30.5"S 49°13'19.1"W
3	Irai	Pinhais	25°26'28.9"S 49°09'02.4"W

As coletas foram realizadas no dia 12 de março de 2016

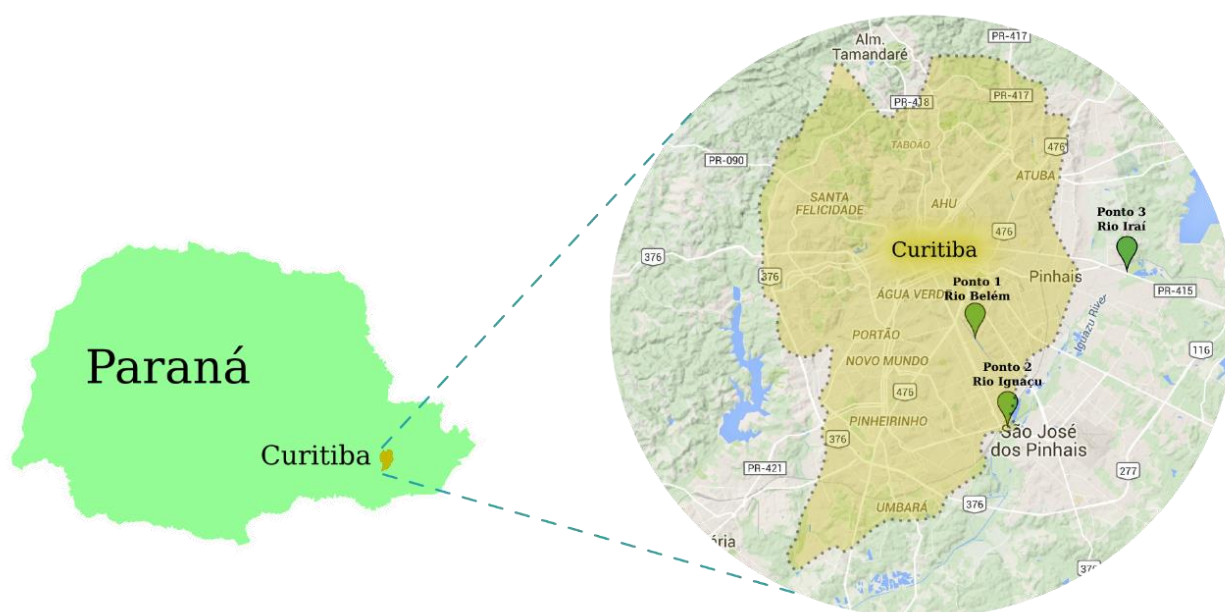


FIGURA 5 – PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS REFERENTES À CIDADE DE CURITIBA

FONTE: A AUTORA



FIGURA 6 – COLETA DE AMOSTRAS DOS RIOS a) BELÉM b) IGUAÇU c) IRAI

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

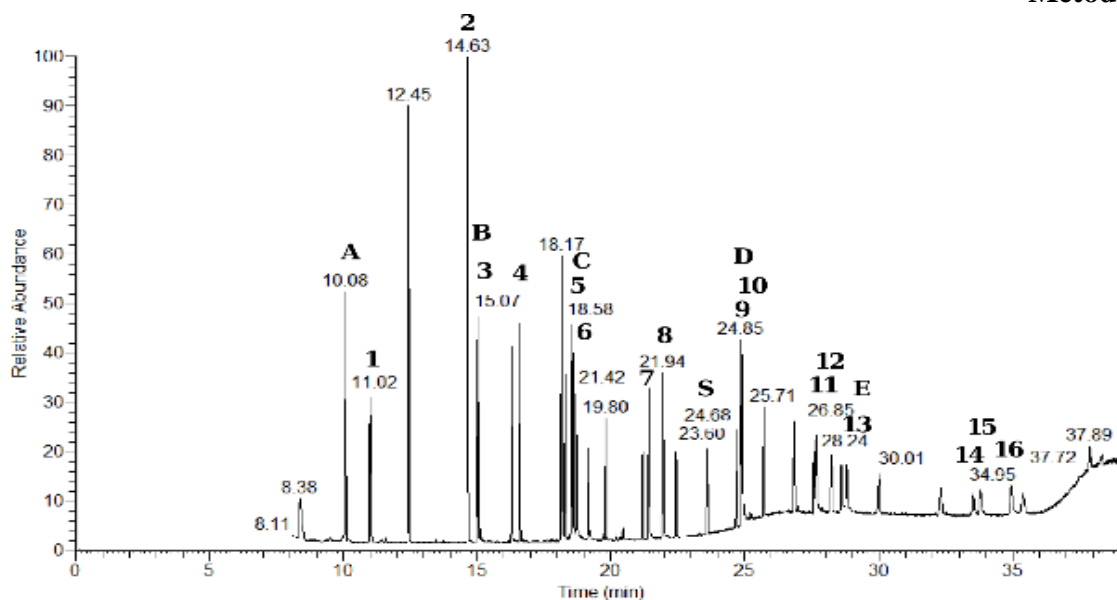
### 4.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Com o objetivo de se obter a melhor resolução possível na determinação simultânea dos 16 HPA, seus 5 padrões internos e o padrão subrogado, foram testadas distintas programações de temperatura no modo de varredura completa (*Full scan*), através do registro contínuo de espectros de massa e da determinação dos tempos de retenção, de modo a identificar os analitos por comparação com bibliotecas de espectros de massa.

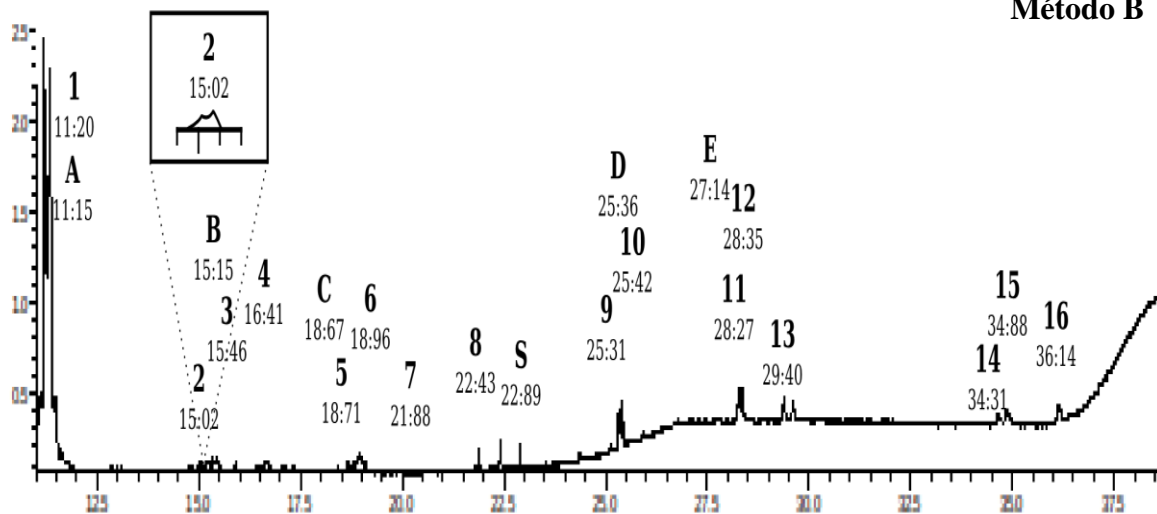
Com a espectrometria de massas deve-se notar que a sensibilidade requerida para o registro do espectro depende da eficiência da fonte de íons, da transmissão através do analisador e dos tempos de permanência dos íons no analisador. O tempo de permanência por massa é dado pela faixa de aquisição de massa (por exemplo, 50 – 550 m/z) e o tempo de íons do cromatograma (por exemplo, 500 ms). Com isto é calculada uma frequência de 1000 Hz. Cada massa da faixa selecionada é medida uma só vez durante o scan por um breve período. Todos os outros íons formados ao mesmo tempo, a partir da substância na fonte de íons, não são detectados durante o scan de massa. Prolongar o tempo de scan pode aumentar a sensibilidade desses sistemas para a operação em *Full scan*, não obstante, existe um limite superior de tempo prolongável para a análise (HÜBSCHMANN, 2009).

Geralmente, na prática, a GC-MS utiliza uma variação de scan de 0,5 – 1 s (HÜBSCHMANN, 2009), tal como o método propõe. Cabe salientar que todas as análises foram desempenhadas em colunas capilares prevalecendo a combinação favorável de seletividade, resolução e sensibilidade para a determinação de HPA em água, segundo o método proposto pela U.S. EPA (2012). A FIGURA 7 apresenta os cromatogramas dos métodos otimizados no modo de varredura completa (**Métodos A e B**).



**Método A**

a)

**Método B**

b)

FIGURA 7 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A a) MÉTODO A, b) MÉTODO B PARA A ANÁLISE DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E O SUBROGADO

**1:** naftaleno **2:** acenaftileno **3:** acenafteno **4:** fluoreno **5:** fenantreno **6:** antraceno **7:** fluoranteno **8:** pireno **9:** benzo[a]antraceno **10:** criseno **11:** benzo[b]fluoranteno **12:** benzo[k]fluoranteno **13:** benzo[a]pireno **14:** indeno[1,2,3-cd]pireno **15:** dibenzo[a,h]antraceno **16:** benzo[g,h,i]perileno **A:**naftaleno-d<sub>8</sub> **B:** acenafteno-d<sub>10</sub> **C:** fenantreno-d<sub>10</sub> **D:** criseno-d<sub>12</sub> **E:** perileno-d<sub>12</sub> **S:** p-terfenil-d<sub>14</sub>

A partir do primeiro cromatograma (**Método A**) pode se observar como os últimos picos, alusivos às moléculas de HPA de maiores massas e pontos de ebulição perdem resolução e intensidade. Isso ocorre pelo tempo relativamente longo de permanência na coluna, favorecendo os equilíbrios entre a fase móvel e a fase estacionária, aumentando o tempo de saída entre a primeira e a última molécula de um composto que elui do sistema cromatográfico (CRISTALE et al., 2008). Considerando a necessidade de uma análise rápida, sem ônus na resolução, além de manter a ordem de eluição e aumentar a detectabilidade, este comportamento, segundo Hübschmann (2009) pode ser evitado aumentando a velocidade de aquecimento da rampa de temperatura, quando um menor tempo de análise é requerido, ou diminuindo a velocidade quando maior resolução cromatográfica é requerida. Porém, conforme os testes preliminares, o aumento da velocidade de aquecimento resulta em uma menor resolução cromatográfica para as moléculas com menores massas, desde o naftaleno com  $128 \text{ g mol}^{-1}$  até o antraceno com  $178 \text{ g mol}^{-1}$  e para os distintos isômeros, causando coeluição dos analitos.

Vários trabalhos de extração de HPA com HF-LPME descritos na literatura envolvem, em geral, o uso do tolueno como solvente extrator (RATOLA et al., 2008, BASHEER et al., 2003). Levando em consideração que os analitos apresentam suficiente solubilidade e estabilidade neste solvente, além da importância de empregar um único solvente para evitar a adição da etapa de secagem e troca de solvente para posterior análise cromatográfica, foi necessário realizar testes utilizando tolueno com o método cromatográfico já otimizado (**Métodos B e D**).

De tal modo, o **método B** (Modo *Full scan* em tolueno) foi operado sob as mesmas condições do **método A** (Modo *Full scan* em diclorometano), com a exceção do *solvent cut*, em um tempo maior devido ao tolueno possuir um ponto de ebulição de  $110,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , superior ao ponto de ebulição do diclorometano ( $39,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo assim, mais retido na coluna cromatográfica. Os resultados foram comparados aos obtidos utilizando diclorometano como solvente.

É importante mencionar que durante o desenvolvimento da otimização do método houve uma série de quedas de sensibilidade do equipamento, fato evidenciado na baixa intensidade dos picos correspondentes aos analitos. Apesar disso, obteve-se boa resolução cromatográfica para os compostos de maior massa, porém os seis picos gerados pelas

moléculas de menor massa molecular (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno) apresentaram um alargamento significativo, dificultando sua identificação (**Método B**). Tais fatos podem ser atribuídos à expansão do volume do solvente, que no modo de injeção sem divisão de fluxo (*Splitless*), determina o volume máximo de injeção em qualquer conjunto de condições (temperatura, pressão e volume do *liner*). Assim, se o volume excede o volume do *liner*, uma parte da amostra fluirá fora da zona deste. Um pulso de pressão é criado sobre a vaporização da amostra que excede a pressão frontal, de forma que o volume de vapor excedido pode voltar através do *inlet* do gás de arraste conduzindo a dois problemas potenciais: alargamento do pico e contaminação do injetor. Como o solvente elui repentinamente através da linha do gás de arraste, ocupa um volume muito maior e, portanto, precisará de muito mais tempo para se transferir para a coluna analítica. Isto causa um alargamento e caudas tanto nos picos do solvente quanto do analito, piorando este problema para solventes com volumes de expansão maiores e menores taxas do fluxo do gás de arraste.

Para evitar ou minimizar este tipo de problemas podem ser utilizadas diversas estratégias tais como: um volume de solvente menor, aumento de pulso de pressão durante a fase de injeção do ciclo de análise, uso de *liners* maiores para garantir um menor escape de vapor, ou inclusive o uso de técnicas de injeção de volumes grandes com programas de vaporização de temperatura (PTV-LVI-GC, *Programmed temperature large volume injection gas chromatography*). Esta última técnica geralmente é usada para a análise de traços por aumentar a sensibilidade através da eliminação do solvente e pré-concentração dos analitos no *liner* para depois serem transferidos à coluna cromatográfica pelo programa de vaporização (DELGADILLO et al., 2013). Para isso é importante que os pontos de ebulição dos solventes sejam suficientemente baixos, com a finalidade de eliminar a maior parte do solvente através do fluxo de ventilação sem perder os analitos mais voláteis (MASTOVSKÁ, 2004). Entretanto, a abordagem mais simples e efetiva é assegurar que o diâmetro interno do *liner* seja suficientemente grande para conter a quantidade de vapor produzida (HANDLEY, 2001). A TABELA 15 mostra uma comparação dos volumes de expansão gerados com injeções de 1 µL dos solventes mais usados em GC. Estes volumes foram obtidos a partir do

software da Agilent Technologies<sup>1</sup> (calculador do volume de expansão), utilizando como referência dados da literatura para corroborar os resultados.

TABELA 15 – VOLUMES DE EXPANSÃO PARA ALGUNS SOLVENTES TÍPICOS USADOS EM ANÁLISES COM GC

Solvente	Ponto de Ebulição (°C)	Expansão do volume (μL)
Acetona	56	280
Acetonitrila	85	392
Acetato de etila	77	210
Ciclohexano	80,7	190
Diclorometano	39,6	-
1-octanol	195	-
Metanol	65	509
Hexano	69	157
Tolueno	110,6	194
Água	100	1142

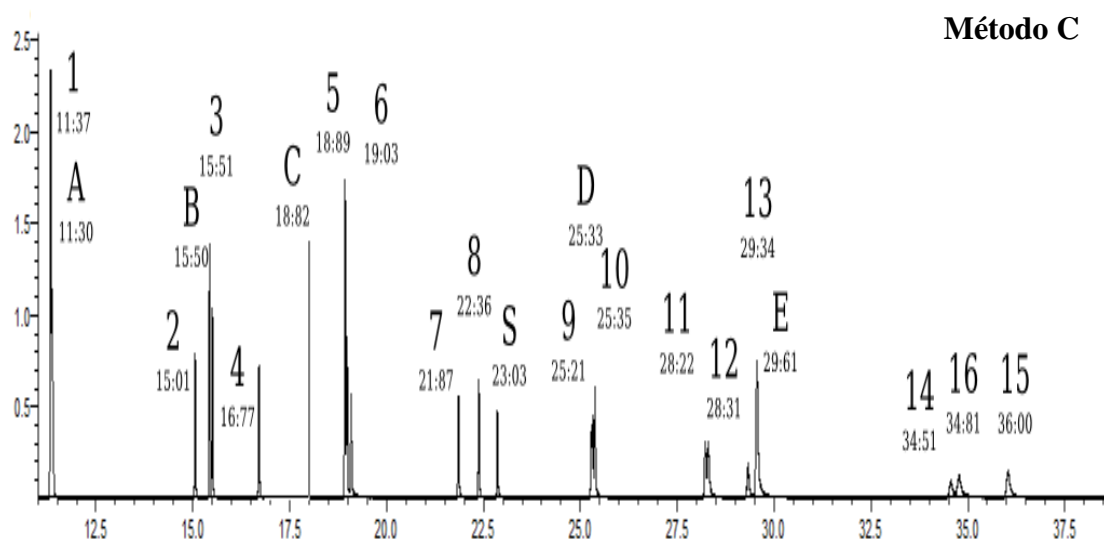
Para 1 μL de injeção a 270°C e 117,6 kPa

FONTE: AGILENT TECHNOLOGIES

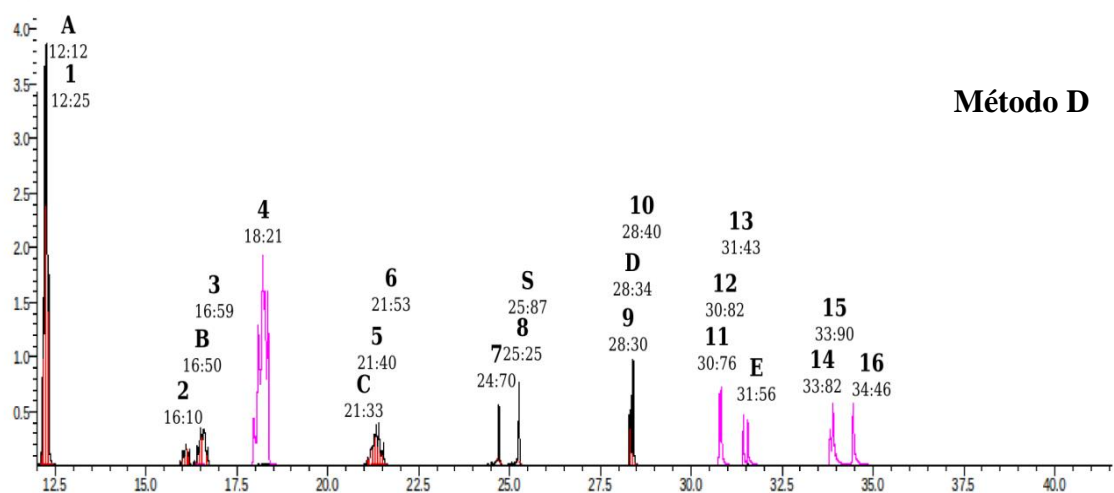
De acordo com os dados fornecidos na TABELA 15 pode-se notar como o volume de expansão do tolueno sob as condições estabelecidas apresenta um valor inferior à capacidade máxima do *liner*, cujo valor é de 670 μL. Portanto, no desenvolvimento do **método D** (FIGURA 8) foram empregadas três estratégias para melhorar a resolução e separação dos compostos. Como primeira estratégia aumentou-se a pressão da fase gasosa de 54 kPa para 117,6 kPa durante a injeção, para reduzir a expansão do volume (e o tempo de permanência no ponto de injeção), suprimindo assim a adsorção e/ou degradação dos analitos (MASTOVSKÁ, 2004). Consequentemente, a temperatura de ebulição do tolueno e de todos os outros compostos diminuiu em função do aumento da pressão de vapor do gás, motivo pelo qual foi necessário modificar o valor do *solvent cut* para 11 min, considerando esse valor como a temperatura calculada para a ebulição do tolueno (110 °C). A segunda estratégia foi a criação de uma nova rampa de aquecimento passando de 50°C min<sup>-1</sup> para 10°C min<sup>-1</sup> (TABELA 11), tomando como base a programação de temperatura proposta por Ratola et al. (2008). E por último a terceira estratégia foi utilizar o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) para acrescentar sensibilidade à análise através da divisão do mesmo tempo de permanência entre alguns íons selecionados mediante o registro de massas individuais,

<sup>1</sup>Obtido de <https://www.agilent.com/en-us/support/gas-chromatography/gccalculators>

proporcionando por sua vez, a identificação e quantificação simultânea dos analitos em vista da capacidade de diferenciá-los dos interferentes da matriz. A FIGURA 8 apresenta os cromatogramas dos métodos otimizados no modo de monitoramento seletivo de íons (Métodos C e D).



a)



b)

FIGURA 8 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A a) MÉTODO C, b) MÉTODO D PARA A ANÁLISE DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E O SUBROGADO

**1:** naftaleno **2:** acenaftileno **3:** acenafteno **4:** fluoreno **5:** fenantreno **6:** antraceno **7:** fluoranteno **8:** pireno **9:** benzo[a]antraceno **10:** criseno **11:** benzo[b]fluoranteno **12:** benzo[k]fluoranteno **13:** benzo[a]pireno **14:** indeno[1,2,3-cd]pireno **15:** dibenzo[a,h]antraceno **16:** benzo[g,h,i]perileno **A:** naftaleno-d<sub>8</sub> **B:** acenafteno-d<sub>10</sub> **C:** fenantreno-d<sub>10</sub> **D:** criseno-d<sub>12</sub> **E:** perileno-d<sub>12</sub> **S:** p-terfenil-d<sub>14</sub>

Assim, o cromatograma correspondente ao **método D**, evidencia a separação melhorada dos picos através do crescimento menor da primeira faixa de temperaturas, porém, os picos dos primeiros seis compostos eluídos, continuaram sendo menos resolvidos quando comparados aos compostos com maior massa molecular. Esta etapa da otimização permitiu separar todos os HPA, com seus respectivos padrões deuterados e subrogado utilizando o tolueno como único solvente sem a necessidade de fazer a troca de solventes para efeitos qualitativos da técnica HF-LPME. Entretanto, para efeitos da quantificação dos HPA foi necessária a secagem do tolueno e reconstituição com diclorometano. Idealmente a troca de solvente que envolve as etapas de secagem e concentração deveria ser evitada quando for possível, mas a incompatibilidade da técnica GC por alguns solventes (com pontos de ebulição muito altos), o custo agregado e complicações envolvidas em técnicas como a PTV-LVI-GC, fazem com que seja inevitável. Não em vão muitos métodos empregam a troca de solvente antes da determinação por GC, sendo o tolueno, o isooctano e o hexano os solventes de troca mais populares (MASTOVSKÁ, 2004). A TABELA 16 apresenta os tempos de retenção dos métodos otimizados no modo SIM em diclorometano e em tolueno para a análise dos compostos alvo.

TABELA 16 – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS 16 HPA, 5 DEUTERADOS E SUBROGADO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS C E D

Número	HPA	Tempos de Retenção (min)	
		Método C	Método D
1	Naftaleno	11,73	12,25
2	Acenaftileno	15,06	16,10
3	Acenafteno	15,50	16,59
4	Fluoreno	16,70	18,21
5	Fenantreno	18,98	21,40
6	Antraceno	19,09	21,53
7	Fluoranteno	21,85	24,70
8	Pireno	22,38	25,25
9	Benzo[a]antraceno	25,28	28,30
10	Criseno	25,38	28,40
11	Benzo[b]fluoranteno	28,22	30,76
12	Benzo[k]fluoranteno	28,30	30,82
13	Benzo[a]pireno	29,32	31,43
14	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	34,55	33,82
15	Dibenzo[a,h]antraceno	34,76	33,90
16	Benzo[g,h,i]perileno	36,04	34,46
ΦP.I	Naftaleno d <sub>8</sub>	11,33	12,12
ΦP.I	Acenafteno d <sub>10</sub>	15,43	16,50
ΦP.I	Fenantreno d <sub>10</sub>	18,93	21,33
ΦP.I	Criseno d <sub>12</sub>	25,32	28,34
ΦP.I	Perileno d <sub>12</sub>	29,55	31,56
ΦΦS	p-terfenil-d <sub>14</sub>	22,86	25,87
Os HPA são apresentados em ordem crescente de tempos de retenção		ΦPadrão Interno	ΦΦSubrogado

#### 4.2. TESTES PRÉVIOS À OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME

Experimentos preliminares consistiram em avaliar as duas configurações principais (em forma de “U” e na forma de “haste”) examinando a seletividade do solvente extrator, o volume da solução aquosa e o comprimento da fibra, com o objetivo de selecionar os principais parâmetros a serem otimizados. Levando em conta a facilidade de manipulação do sistema, assim como a eliminação da etapa de selamento da fibra, onde é possível ocorrer contaminação, a configuração em forma de “U” foi escolhida para desenvolver todas as extrações.

Com respeito à escolha do solvente extrator é importante ter em vista, principalmente sua solubilidade com respeito aos compostos a extrair, e sua volatilidade. Quanto maior for a afinidade entre os analitos e o solvente orgânico, mais eficiente será a extração, a qual dependerá fundamentalmente da afinidade polar do solvente extrator com estes compostos. Durante o estudo com o hexano e com o ciclohexano como solventes extratores, foi evidente observar sua alta volatilidade, respeitando aos valores maiores de pressão de vapor, assim como uma maior solubilidade no meio aquoso (contendo acetona e metanol) quando comparados com o tolueno, dados concordantes com os apresentados na TABELA 17. Isto dificultou a retirada do solvente da fibra oca mesmo com a adição de NaCl na solução aquosa, empregada para modificar a polaridade do meio aquoso como será discutido posteriormente. Um aspecto importante a ressaltar no uso do ciclohexano, foi sua capacidade de destruir a fibra com apenas alguns minutos de contato, particularidade que junto com as propriedades discutidas acima, confirmaram sua exclusão frente ao hexano como solventes extratores. Esta situação foi contrária quando utilizado o tolueno como solvente, dada sua baixa volatilidade e solubilidade em água (TABELA 17), evitando assim sua evaporação durante o processo de extração. Com base nisso, o tolueno foi considerado o solvente com maior seletividade e eficiência de extração, além de ter menor viscosidade adequada para garantir altos coeficientes de difusão através da fibra, dados corroborados pela literatura (BASHEER et al., 2003 & CHARALABAKI et al., 2005).

Outro aspecto que vale a pena salientar no que diz respeito ao tolueno como melhor solvente de extração, é que, por apresentar um ponto de ebulição de 110°C sua utilização na técnica de GC se torna viável, pois o primeiro composto a ser eluído (naftaleno) apresenta uma temperatura de ebulição maior (120 °C) quando é empregada uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>, isto é, uma pressão de 117,6 kPa. Em alguns casos, um solvente com volatilidade mais elevada apresenta duas principais desvantagens no processo de extração: por um lado, o manuseio da amostra pode mudar o volume do extrato e por outro, uma maior exposição do analista aos vapores dos solventes. Contudo, ao trocar o solvente antes da análise por GC, maior volatilidade se torna mais vantajosa, assim é preferível evitar a troca se for possível em função de uma menor perda de amostra (MASTOVSKÁ, 2004).

TABELA 17 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOLVENTES AVALIADOS

Solvente	*Polaridade	ΦSolubilidade em água (%m/m) a 25 °C	ΦPonto de Ebulição (°C)	ΦPressão de Vapor (kPa) a 21 °C
Tolueno	↓	5,2 x 10 <sup>2</sup>	110,6	3,09
Ciclohexano		5,5 x 10 <sup>3</sup>	80,7	10,50
Hexano		9,5 x 10 <sup>4</sup>	69	17,06

FONTES: \*(LAMARQUE, 2008)

Φ(SMALLWOOD, 1996)

Outra variável avaliada foi o comprimento da fibra, o qual está relacionado com o manuseio das seringas e com o volume da solução aquosa. Deste modo, quando foi testado um menor volume de solução doadora (10 mL) com um maior comprimento de fibra (10 cm), ocorreram problemas de interferência da barra de agitação com a disposição da fibra, impossibilitando tanto a retirada do tolueno quanto o processo de extração. Apesar da maior área superficial relativa à solução aquosa, é importante lembrar que para favorecer o fator de enriquecimento tem que se aumentar o decréscimo na razão entre os volumes da fase doadora e receptora (MERIB et al., 2013), por conseguinte os valores selecionados foram de 5 cm de comprimento (14,3 µL) com 20 mL de solução doadora.

#### 4.3. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA HF-LPME

Além da razão das fases receptora e doadora, entre outras variáveis examinadas previamente, outros parâmetros que afetam a eficiência da extração foram investigados, tais como o cosolvente, a velocidade de extração, a quantidade do sal e o tempo de extração. O caráter hidrofóbico dos HPA faz com que estes tenham uma solubilidade muito baixa em água (por exemplo, 0,26 µg L<sup>-1</sup> para o dibenzo[a,h]antraceno), a qual leva a problemas de adsorção durante a amostragem, armazenamento e extração dos mesmos



(NOKWETHEMBA, 2012). Dada esta condição, são utilizados cosolventes durante a extração para incrementar a solubilidade destes compostos no meio aquoso, levando em consideração que os HPA geralmente se encontram em baixas concentrações nos corpos de água natural. Assim, o objetivo foi testar a solubilidade dos HPA com dois tipos de solventes orgânicos em meio aquoso, um aprótico (acetona) e um prótico (metanol) de alta polaridade.

A adição de sal e a consequente mudança da força iônica da solução da amostra pode ter vários efeitos na extração, diminuindo a solubilidade dos analitos, e dessa forma, aumentando a eficiência de extração em virtude do efeito *salting-out* (MERIB et al., 2013). Geralmente, a adição de sal em sistemas líquido-líquido introduz forças iônicas que inevitavelmente afetam o equilíbrio, particularmente para líquidos parcialmente miscíveis. Nesses casos, quando os íons são solvatados, uma parte da água deixa de estar disponível para o soluto, o qual é então afastado da solução aquosa, pois diminui sua solubilidade em água devido à presença de tais sais inorgânicos (HASSEINE et al., 2009). Este efeito pode ser aplicado à remoção de compostos orgânicos de matrizes aquosas, ou neste caso, para facilitar a transferência dos analitos orgânicos a um solvente afim que esteja presente.

Outros fatores extremamente importantes são o tempo de extração e a taxa de agitação. Geralmente a agitação é aplicada para acelerar a cinética da extração, tendo em vista que o processo de transferência de massa é dependente do tempo para alcançar o equilíbrio (MERIB et al., 2013). O estudo dos parâmetros foi determinado mediante a comparação das respostas das áreas obtidas dos cromatogramas, a partir da injeção da solução receptora logo após a microextração com a fibra oca, usando amostras de água ultrapura acrescidas de uma concentração conhecida de HPA ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As respostas obtidas necessárias para o cálculo dos efeitos, a partir do planejamento fatorial  $2^3$ , se encontram no APÊNDICE 1.

Através do gráfico de Pareto padronizado com 95 % de confiança (FIGURA 9) é possível visualizar os efeitos principais e as interações obtidas entre as variáveis do planejamento fatorial  $2^3$  para o fenantreno como representante dos três compostos que apresentaram efeitos de terceira ordem. O valor absoluto dos efeitos estimados é proporcional à extensão da barra horizontal mostrada no gráfico, onde a significância relativa dos efeitos pode ser facilmente visualizada. Os erros padrão  $S_E$  foram multiplicados pela constante  $t$  de *Student* ( $t_2=4,303$ ) obtendo-se um produto  $S_{Et}$  apresentado graficamente como uma linha vertical em cada gráfico. Tanto os efeitos principais como os de interação foram considerados significativos

nos casos em que seu valor absoluto foi maior ou igual a  $S_{Et}$  (LEITE, 2008). Esta análise é considerada de igual forma para os consequentes planejamentos fatoriais  $2^2$ , sendo exposto o gráfico de um ou dois dos compostos para representar os 16 analitos de interesse.

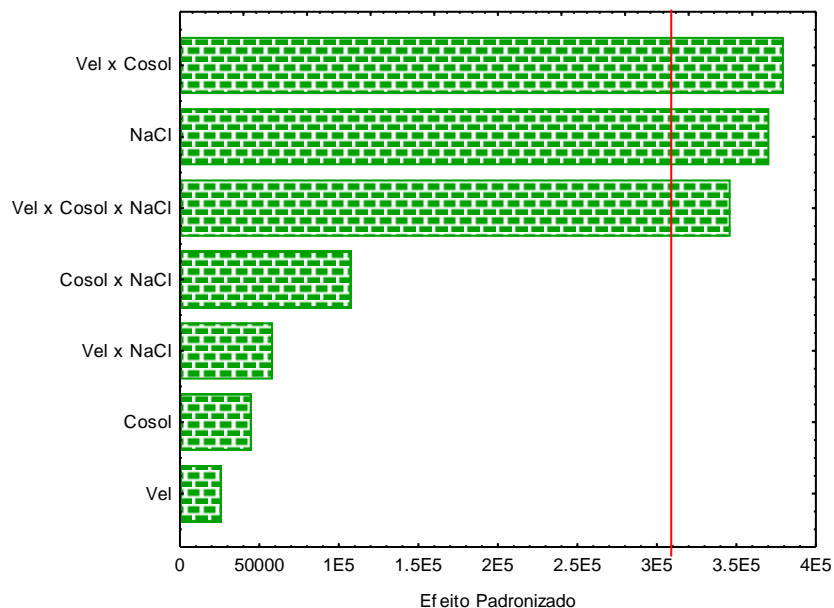


FIGURA 9 – GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO FENANTRENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$ . VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE

À vista disso, é possível observar o efeito de primeira ordem do sal, efeito de segunda ordem da interação entre a velocidade e o cosolvente, e de terceira ordem da interação entre o sal, a velocidade e o cosolvente. Da mesma maneira, verificou-se para o naftaleno, acenaftileno e fluoreno os efeitos de primeira e segunda ordem, e de terceira ordem para o acenaftileno, fluoreno e o fenantreno. As TABELAS 18, 19 e 20 mostram os efeitos correspondentes a esses compostos e seus erros-padrão.

TABELA 18 – EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO  $2^3$

Efeitos de Primeira Ordem	Área			
	Naftaleno	Acenaftileno	Fluoreno	Fenantreno
Velocidade	$-(1,4 \pm 1,2) \times 10^6$	$-(4,9 \pm 0,7) \times 10^5$	-	-
Cosolvente	-	$-(1,8 \pm 0,7) \times 10^5$	-	-
NaCl	-	$-(5,5 \pm 0,7) \times 10^5$	$-(3,2 \pm 3,1) \times 10^5$	$-(3,7 \pm 3,1) \times 10^5$

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.

TABELA 19 – EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO  $2^3$ 

Efeitos de Segunda Ordem	Área			
	Naftaleno	Acenaftileno	Fluoreno	Fenantreno
Velocidade x Cosolvente	-	$(2,3 \pm 0,7) \times 10^5$	$-(4,2 \pm 3,1) \times 10^5$	$-(3,8 \pm 3,1) \times 10^5$
Velocidade x NaCl	$(1,6 \pm 1,2) \times 10^6$	$(4,6 \pm 0,7) \times 10^5$	-	-
Cosolvente x NaCl	-	$(2,4 \pm 0,7) \times 10^5$	-	-

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.

TABELA 20 – EFEITOS DE TERCEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO  $2^3$ 

Efeitos de Terceira Ordem	Área		
	Acenaftileno	Fluoreno	Fenantreno
Velocidade x Cosolvente x NaCl	$-(2,7 \pm 0,7) \times 10^5$	$(3,5 \pm 3,1) \times 10^5$	$(3,5 \pm 3,1) \times 10^5$

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.

Os efeitos de terceira ordem podem ser interpretados como contrastes geométricos através de um cubo, cujos vértices correspondem aos 8 ensaios. Os efeitos principais e as interações de dois fatores são contrastes entre dois planos, que podem se identificar examinando os coeficientes de contraste (NETO, 2010). Estas representações em cubos são mostradas para o acenaftileno e para o fenantreno, como os representantes dos 3 HPA que apresentaram efeitos de terceira ordem do planejamento  $2^3$ :

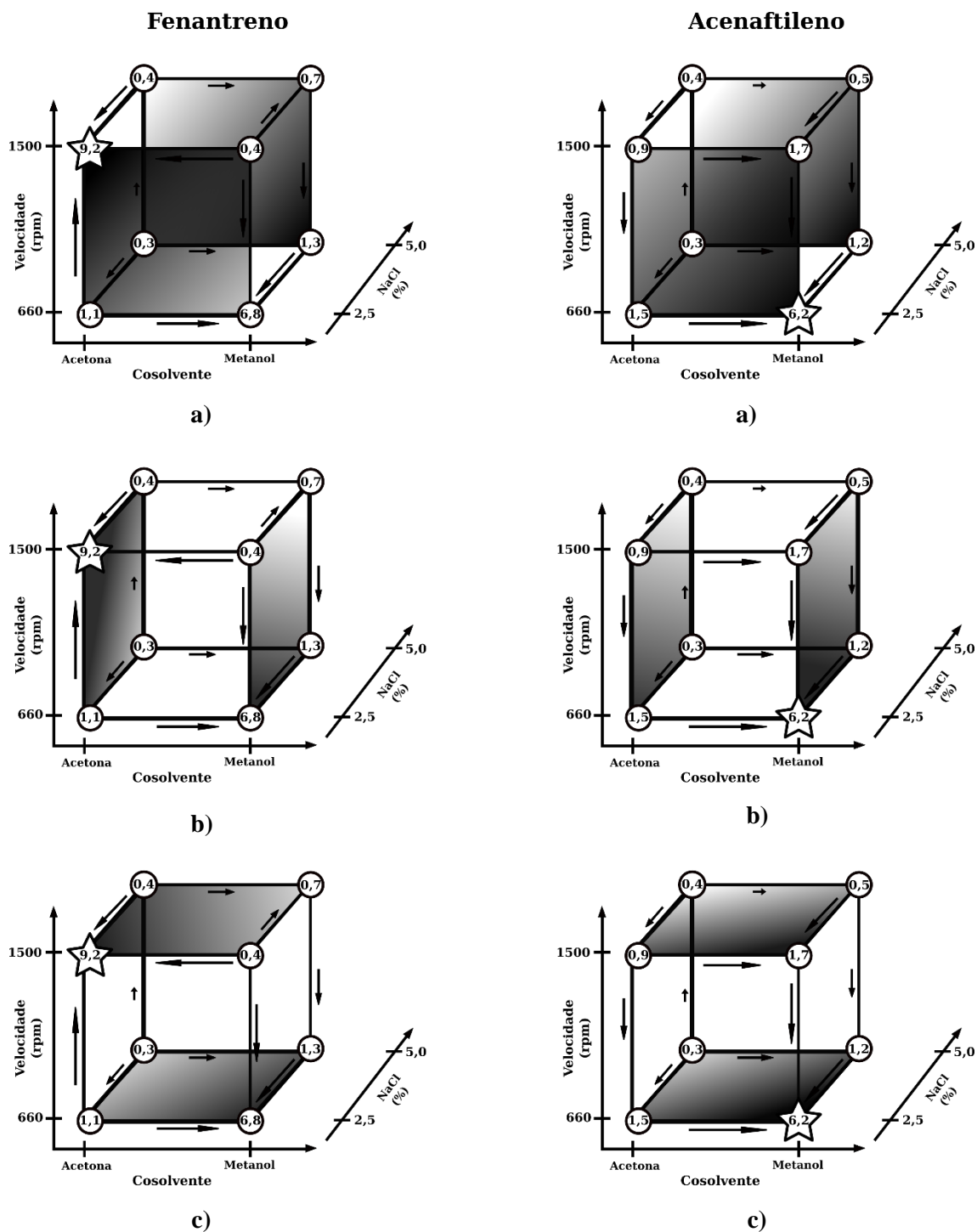


FIGURA 10 – INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS COMBINADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$  PARA O ACENAFTILENO E O FENANTRENO: **a)** PLANO DA VELOCIDADE COM O COSOLVENTE **b)** PLANO DA VELOCIDADE COM NaCl **c)** PLANO DO COSOLVENTE COM NaCl  
DADOS ARREDONDADOS EXPRESSOS COMO  $1 \times 10^5$

Examinando os gráficos cúbicos das respostas, pode-se analisar como as diferenças numéricas evidenciam as tendências, expressas com setas, das maiores áreas sobre os eixos que representam cada variável; os comprimentos das setas são proporcionais à diferença das respostas. No caso dos efeitos combinados é empregada a representação com áreas sombreadas, nas quais a parte mais escura aponta às melhores condições. Por sua vez, o ensaio marcado com uma estrela indica a melhor combinação dos três fatores principais. As interações dos dois fatores de velocidade e cosolvente definem duas interações quando se analisam os planos velocidade por cosolvente (FIGURA 10 a)), assim dois pares de condições são favorecidas, a acetona com a maior velocidade (1500 rpm) para o fenantreno, e a menor velocidade (660 rpm) junto com o metanol como cosolvente para o acenaftileno e o fluoreno. Quando comparados os crescimentos sobre os eixos da velocidade e do cosolvente é confirmado um peso maior nas magnitudes dos vetores no plano do cosolvente do que no plano da velocidade, comprovando a liderança no efeito cruzado do cosolvente.

No que diz respeito ao efeito combinado da concentração de sal com os outros fatores de velocidade e cosolvente (FIGURA 10 b) e c)), pode se observar como a menor presença de NaCl (2,5 %) favoreceu a extração dos três analitos, condição que também propicia a extração para o resto dos HPA. Isto ocorre provavelmente devido ao aumento da viscosidade e da densidade da fase aquosa, reduzindo a dissolução do tolueno em presença do cosolvente. A concentrações maiores de sal, o efeito *salting-out* afeta negativamente a cinética do processo e, conseqüentemente, a eficiência da extração (NOKWETHEMBA, 2012).

Com base neste fato, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  empregando os mesmos dados, desconsiderando o sal como variável, para estudar o efeito combinado entre a velocidade e o cosolvente de uma forma mais específica de acordo com a TABELA 21, a fim de evidenciar a relação entre essas variáveis. As TABELAS 22 e 23 apresentam os efeitos de primeira e segunda ordem, dados que também podem ser observados através dos gráficos de Pareto (FIGURA 11) do fenantreno e do dibenzo[a,h]antraceno, como representantes dos compostos mais leves e dos mais pesados, respectivamente, que apresentaram efeitos de segunda ordem. Os resultados das respostas se apresentam no APÊNDICE 2.

TABELA 21 – PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup> PARA ESTUDAR OS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE HF-LPME

Parâmetro	Fator	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Velocidade (rpm)	V	10	15	20
Cosolvente 20% (%v/v)	C <sub>o</sub>	10	15	20
Experimentos	Parâmetros			
	V	C <sub>o</sub>		
1	-	-		
2	+	-		
3	-	+		
4	+	+		
5	0	0		
6	0	0		
7	0	0		

Fibra oca de polipropileno, pH 7,50, 25 °C, 20 mL de solução aquosa, 5 cm de comprimento de fibra (14,13 µL) e 15 minutos de tempo de extração.

O volume do extrator foi calculado pela equação do cilindro:  $V = \Pi \cdot r^2 \cdot h$  com “r” como o raio e “h” como o comprimento da fibra oca.

Os zeros representam os experimentos realizados em triplicata no Nível (0)

TABELA 22 – EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup>

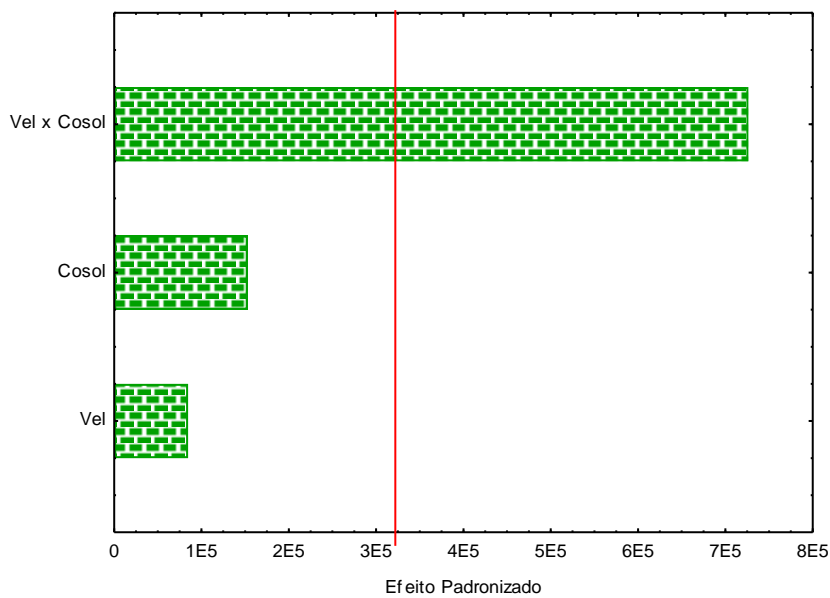
HPA	Efeitos de primeira ordem	
	Velocidade	Cosolvente
Naftaleno	$-(2,3 \pm 1,2) \times 10^6$	$(1,9 \pm 1,2) \times 10^6$
Acenaftileno	$-(9,5 \pm 0,07) \times 10^6$	$-(4,2 \pm 0,07) \times 10^6$

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.

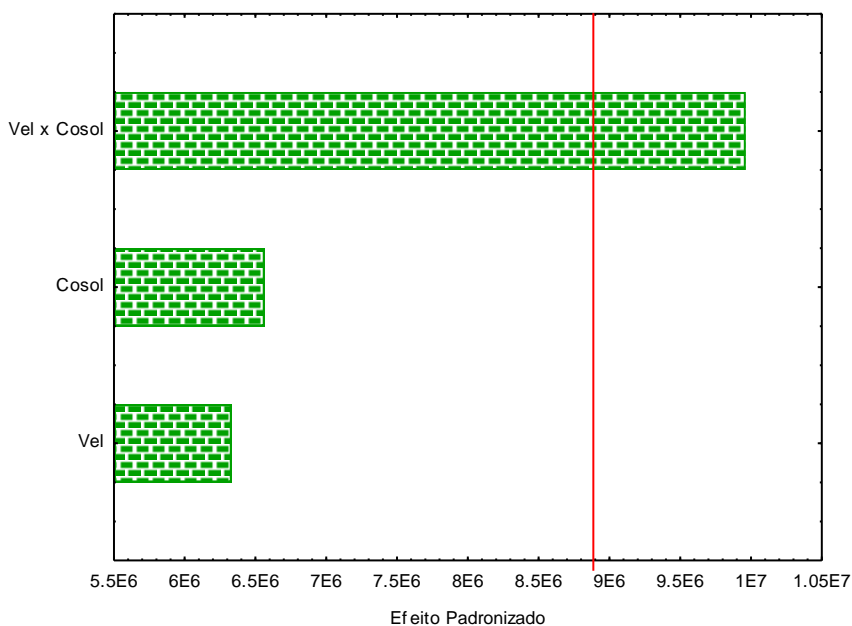
TABELA 23 – EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup>

HPA	Efeitos de segunda ordem
	Velocidade x Cosolvente
Acenaftileno	$(0,5 \pm 0,07) \times 10^6$
Fluoreno	$-(0,8 \pm 0,3) \times 10^6$
Fenantreno	$-(0,7 \pm 0,3) \times 10^6$
Antraceno	$-(1,8 \pm 1,6) \times 10^6$
Fluoranteno	$-(5,1 \pm 4,8) \times 10^6$
Pireno	$-(6,4 \pm 5,3) \times 10^6$
Benzo[a]antraceno	$-(7,7 \pm 6,5) \times 10^6$
Criseno	$-(9,9 \pm 8,1) \times 10^6$
Benzo[b]fluoranteno	$-(8,6 \pm 8,1) \times 10^6$
Benzo[k]fluoranteno	$-(10,8 \pm 9,4) \times 10^6$
Benzo[a]pireno	$-(10,1 \pm 8,1) \times 10^6$
Dibenzo[a,h]antraceno	$-(10,0 \pm 8,8) \times 10^6$
Benzo[g,h,i]perileno	$-(10,2 \pm 8,1) \times 10^6$

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.



a)



b)

FIGURA 11 – GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO **a)** FENANTRENO E DO **b)** DIBENZO[A,H]ANTRACENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^2$   
VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE

Como o efeito de interação é significativo para esses compostos, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. Para isso, representa-se o planejamento experimental em um sistema cartesiano, com um eixo para cada fator. Com apenas dois

fatores, o espaço definido por eles é um plano, podendo colocar os quatro ensaios nos vértices de um quadrado (NETO, 2010). A FIGURA 12 mostra o fenantreno e o dibenzo[a,h]antraceno como os compostos representantes dos HPA de menor e maior massa molecular, respectivamente.

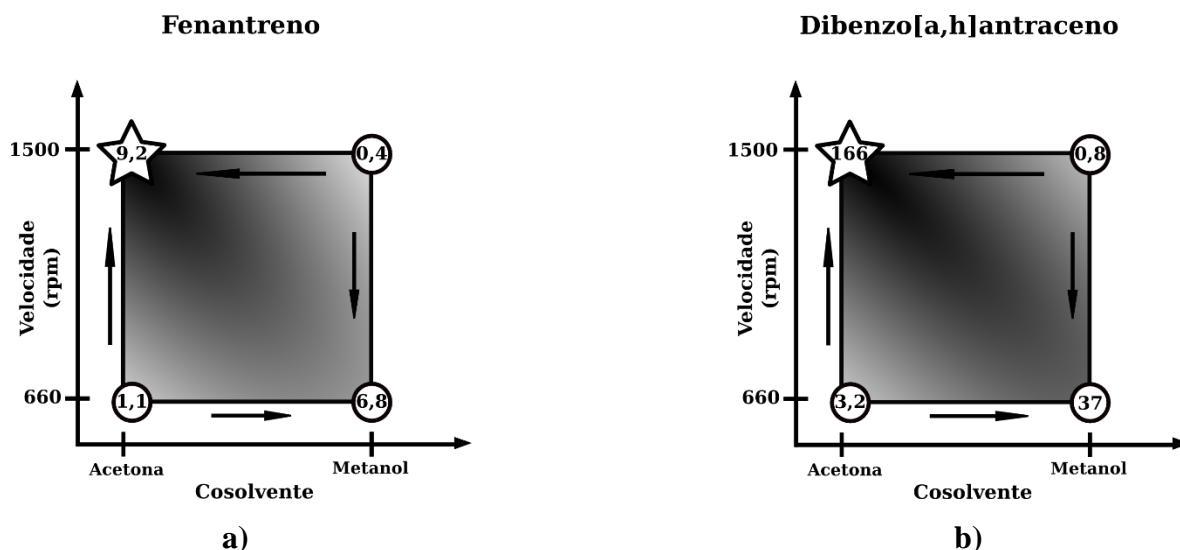


FIGURA 12 – DIAGRAMA PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^2$  PARA a) FENANTRENO b) DIBENZO[A,H]ANTRACENO

Interpretando o diagrama para o fenantreno e para o dibenzo[a,h]antraceno, pode-se observar um crescimento das respostas quando utilizada uma maior velocidade com a acetona como cosolvente, representando por sua vez o comportamento inverso quando utilizado uma menor velocidade e metanol como cosolvente.

Baseado em resultados obtidos de estudos univariados é sabido que a agitação da amostra promove a extração e reduz o tempo de equilíbrio termodinâmico, especialmente para os analitos com altas massas moleculares (FONTANALS et al., 2006 *apud* NOKWETHEMBA, 2012). Porém, ao analisar os efeitos de interação pode se distinguir a situação contrária para o acenaftileno, pois esse apresentou uma maior resposta quando submetido a baixas velocidades com a acetona como cosolvente. Não obstante, esta situação é contrária para o dibenzo[a,h]antraceno e para o resto dos HPA, com maiores massas moleculares, pois revelaram que com o valor máximo de velocidade (1500 rpm) e acetona como cosolvente, a extração alcançou as maiores respostas.



Quando falamos do caráter polar das moléculas orgânicas, neste ou em outros contextos, é preciso ter em conta que este é dado pela presença de um ou vários grupos polares, mas que toda a molécula orgânica possui uma parte apolar formada por ligações C-C e C-H. A importância relativa destas duas partes, polar e apolar, é que determina o caráter final do composto. Isto permite entender, no caso do metanol e da acetona, nos quais predomina o caráter polar pertencente ao grupo hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) e ao grupo carbonila ( $\text{C=O}$ ), respectivamente, sua capacidade para formar interações do tipo dipolo permanente–dipolo permanente com a água, aspecto que lhe confere uma maior solubilidade (LAFUENTE et al., 1997). Contudo, as ligações de hidrogênio presentes nas interações entre o metanol e a água aumentam a afinidade entre estes dois solventes em maior medida do que no caso da acetona. Porém, esta última estabelece uma interação mais apropriada do que o metanol entre os compostos de interesse no meio aquoso. De tal forma, a combinação da acetona com a maior velocidade de agitação foram os parâmetros selecionados para o favorecimento da extração dos 16 HPA, fato concordante com Ratola et al. (2008) e King et al. (2002).

Segundo Hasseine et al. (2009), no sistema água-tolueno-acetona, a adição de sal incrementa o coeficiente de atividade do soluto, provocando o *salting-out* da acetona. Esse comportamento se deve ao fato de que as moléculas de sal concorrem com aquelas do soluto pelas moléculas de água, provocando assim um déficit nos reservatórios de solvatação ao redor do soluto orgânico, o qual pode se liberar para se movimentar e migrar à fase orgânica.

Uma vez estabelecidas as condições do primeiro planejamento fatorial  $2^3$  e confirmadas através da análise do segundo, foi levado a cabo um terceiro planejamento fatorial  $2^2$  para definir a concentração do cosolvente, já que quando é utilizado em grandes concentrações pode enfraquecer a difusão dos analitos no tolueno e inclusive aumentar a solubilidade na fase aquosa. Os limites superiores e inferiores foram estipulados de acordo com os valores estudados do primeiro planejamento. Deste modo, as concentrações de acetona avaliadas foram de 20% e 10%, e 15% como ponto central, os resultados das respostas se apresentam no APÊNDICE 3, representadas também no gráfico de Pareto da FIGURA 12. Como não foram obtidos efeitos de segunda ordem, apenas os efeitos de primeira ordem estão expostos na TABELA 24.

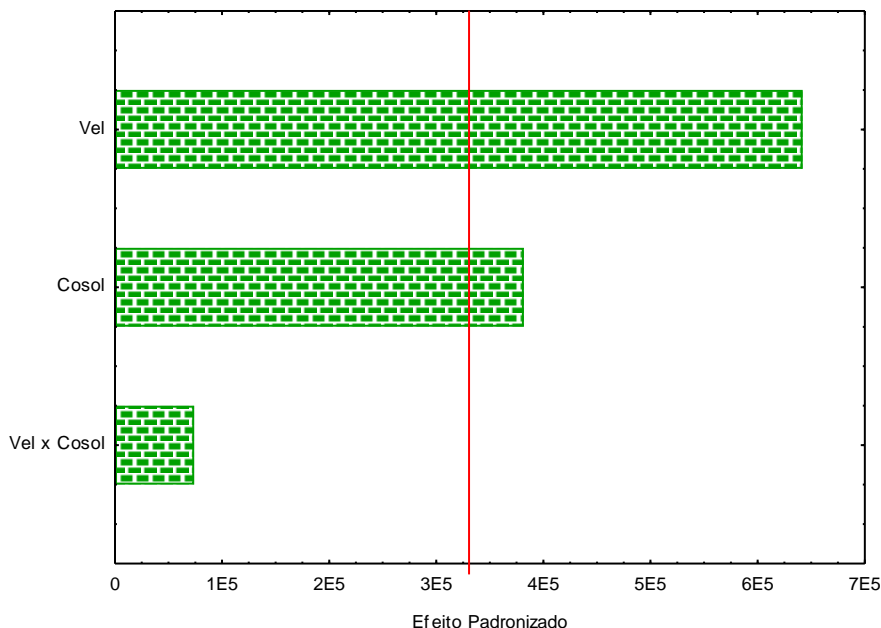


FIGURA 13 – GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO (P=95%) PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO FENANTRENO DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$  VEL: VELOCIDADE COSOL: COSOLVENTE

TABELA 24 – EFEITOS DE PRIMEIRA ORDEM CALCULADOS PARA O PLANEJAMENTO  $2^2$

Efeitos Primeira Ordem	Área	
	Acenaftileno	Fenantreno
Concentração	$-(1,2 \pm 0,9) \times 10^6$	$-(0,6 \pm 0,3) \times 10^6$
Tempo	-	$-(0,4 \pm 0,3) \times 10^6$

Os erros-padrão foram multiplicados pelo ponto da distribuição de *Student*  $t_2=4,303$  com 95% de confiança.

Apesar de nenhum dos 16 compostos ter apresentado efeitos de segunda ordem, foram analisados os efeitos de primeira ordem do acenaftileno e do fenantreno com o intuito de estabelecer as melhores condições de extração (concentração de acetona e tempo de extração). Assim, foram obtidos dois pares de condições para estes compostos, ambos favorecidos por menor concentração de acetona (10 %), com a diferença de um menor e maior tempo de extração para o fenantreno e o acenaftileno, respectivamente. Considerando-se que a transferência de massa é um processo dependente do tempo, para o caso do fenantreno um menor tempo de extração demonstrou ser suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico. Ao analisar as respostas correspondentes aos efeitos principais é evidente perceber a predominância de um menor tempo de extração para a grande maioria dos HPA, no entanto a concentração de acetona é dividida entre os compostos com menor e maior

massa molecular, observando-se um aumento das respostas para 10 e 20 %, respectivamente. Ou seja, é necessária uma maior concentração de acetona para solubilizar os compostos com maiores massas moleculares. Contudo, salvo o acenaftileno e o fenantreno para nenhum outro composto a concentração de acetona apresentou efeitos significativos, e por este motivo foram escolhidos como os parâmetros otimizados 10 % de acetona e tempo de extração de 10 min, destacando-se uma baixa concentração do cosolvente em conformidade com o objetivo ambiental procurado. Para visualizar a diferença qualitativa do método de HF-LPME prévio e posterior à otimização é apresentada a FIGURA 14:

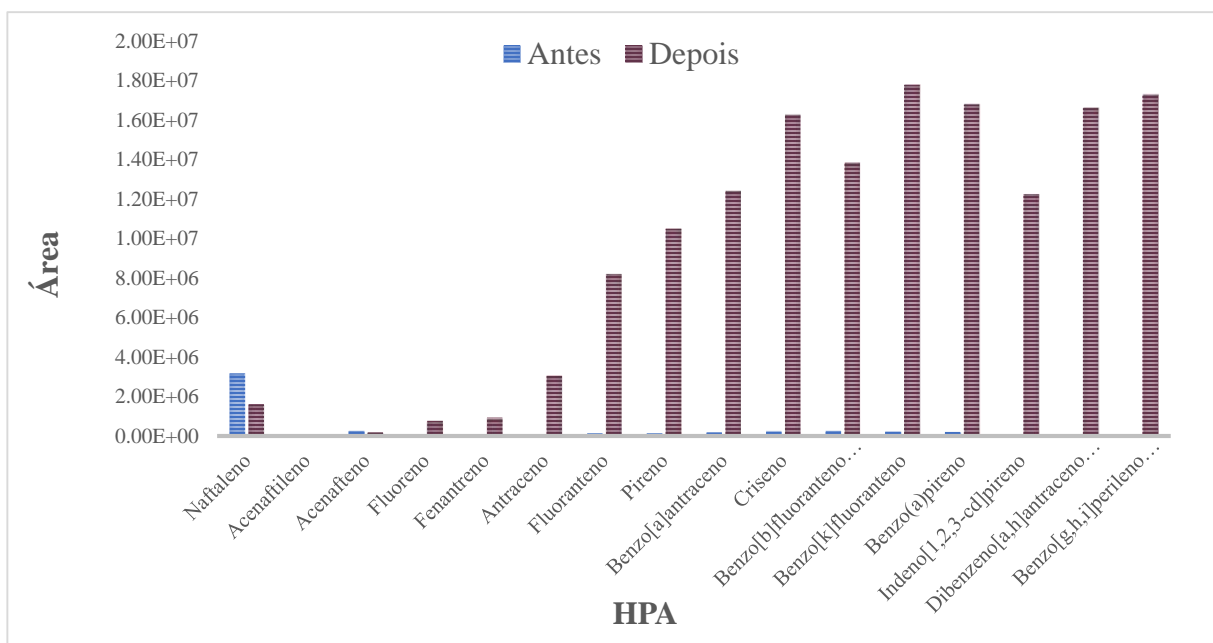


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DAS RESPOSTAS EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS ANTES E DEPOIS DE SEREM OTIMIZADOS

#### 4.3.1 AJUSTES FINAIS DA HF-LPME

Uma vez definidos os parâmetros da otimização, optou-se por avaliar mais dois fatores relacionados com a eficiência da extração, porém em concentrações de HPA menores às que foram empregadas para o processo de otimização. Por um lado, a etapa de secagem tanto com nitrogênio quanto com o concentrador rotativo a vácuo, e por outro, a presença ou não de acetona no meio aquoso. As soluções aquosas receberam alíquotas das soluções padrão de HPA e subrogado na concentração de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  adicionando uma alíquota de solução de padrão interno na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , após a extração. A FIGURA 15 apresenta os resultados obtidos das recuperações em função dos dois sistemas de secagem, para verificar

se os HPA sob temperaturas mínimas (5°C) e velocidade de 1500 rpm sofriam degradação ou volatilização, sendo calculadas segundo as equações (5) e (6), expostas na introdução.

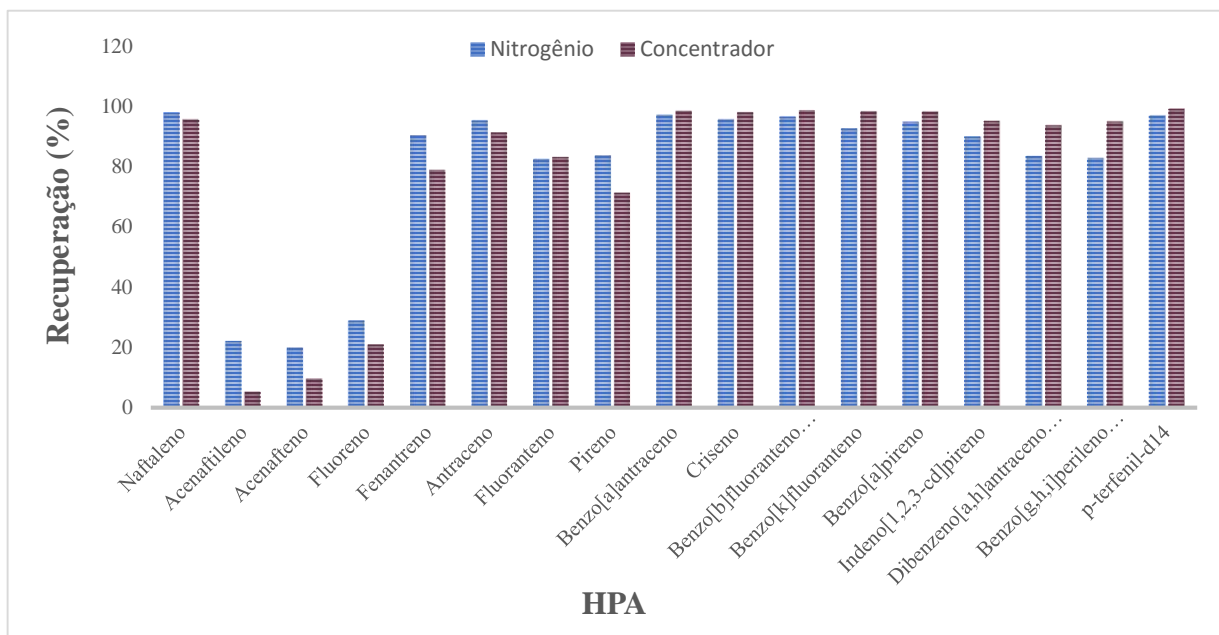


FIGURA 15 – RECUPERAÇÕES DE HPA OBTIDAS UTILIZANDO DOIS MÉTODOS DE SECAGEM: O NITROGÊNIO (2 MIN PARA CADA AMOSTRA) E O CONCENTRADOR ROTATIVO A VÁCUO A 5 °C E 1500 RPM (1 MIN PARA TODAS AS AMOSTRAS)

A partir dessa figura pode-se constatar a semelhança das recuperações quando utilizados os dois métodos de secagem, distinguindo-se as vantagens do concentrador perante ao nitrogênio, com o tempo de secagem sendo de 1 min para todas as amostras no concentrador *versus* 2 min para cada amostra no caso do fluxo de nitrogênio.

O segundo fator estudado consistiu na presença de acetona como cosolvente para verificar se há aumento da difusão dos HPA no meio aquoso em presença do sal. Para estes testes foi utilizado o concentrador como técnica de secagem, conforme os resultados satisfatórios previamente discutidos. A FIGURA 16 mostra os resultados obtidos:

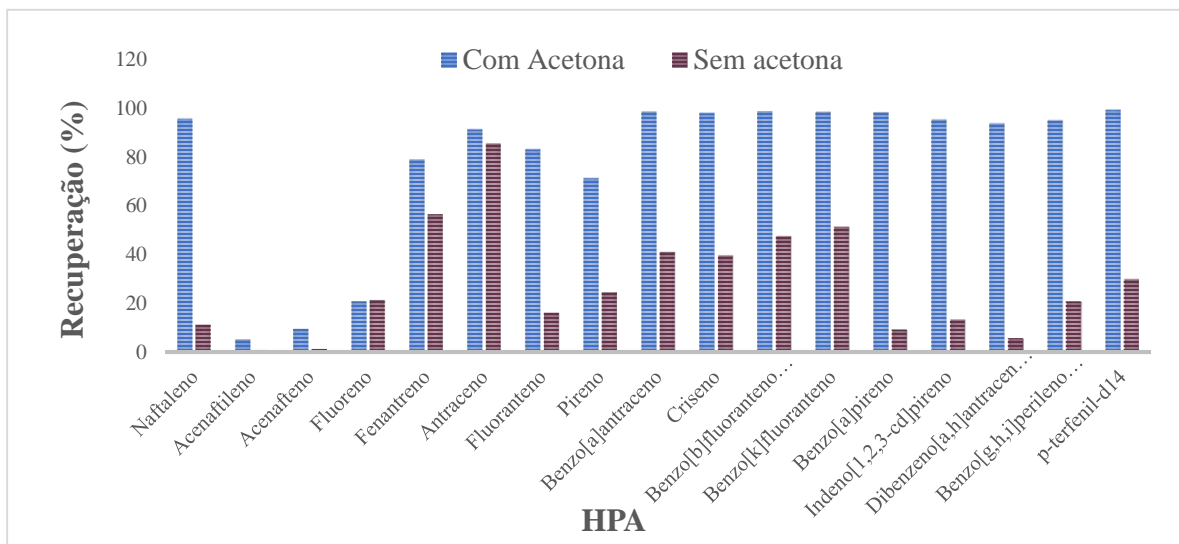


FIGURA 16 – RECUPERAÇÕES DE HPA OBTIDAS UTILIZANDO ACETONA E SUA AUSÊNCIA NO MEIO AQUOSO COM O CONCENTRADOR COMO MÉTODO DE SECADO

Conforme à FIGURA 16, é possível visualizar como a presença de acetona aumenta significativamente as recuperações, observando uma maior influência sobre aqueles com maiores massas moleculares. Finalmente, a TABELA 25 contém os parâmetros otimizados para o método de extração simultânea dos 16 HPA:

TABELA 25 – PARÂMETROS OTIMIZADOS DOS TRÊS PLANEJAMENTOS FATORIAIS PARA A HF-LPME

Parâmetro	Valor otimizado
Velocidade	1500 rpm
Cosolvente	Acetona
Concentração de Acetona	10 % (%v/v)
Concentração de NaCl	2,5 % (%m/v)
Tempo de extração	10 min
*Secagem do solvente	Concentrador rotativo a vácuo

\*Parâmetro avaliado univariadamente.

#### 4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME

##### 4.4.1. Parâmetros Analíticos de Mérito

Com o objetivo de validar o método otimizado foram avaliados alguns parâmetros de mérito tais como linearidade, limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (precisão inter-corrida e precisão intra-corrida) e exatidão (testes de recuperação). Foi construída uma curva analítica através do preparo de 7 soluções padrão de HPA dissolvidas em diclorometano, determinadas em triplicata com concentrações de 10; 75; 140;

205; 270; 335 e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para cada concentração foi agregada uma alíquota fixa da solução padrão dos padrões internos para atingir uma concentração intermediária da curva de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  e uma alíquota do padrão subrogado p-terfenil- $\text{d}_{14}$  para atingir a concentração correspondente a cada ponto. Adicionalmente, foi efetuada uma curva pós-extração, mediante com cinco extrações em água enriquecidas com alíquotas de solução padrão de HPA e subrogado para atingir concentrações de: 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Cada extração foi realizada em triplicata de acordo com o método proposto, recebendo uma alíquota de padrão interno correspondente a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  antes de sua determinação por GC-MS.

O p-terfenil- $\text{d}_{14}$  é um composto deuterado, no qual o deutério substitui o hidrogênio (FIGURA 17), análogo aos analitos de interesse, que é comumente utilizado em GC-MS para avaliar o desempenho da extração através do monitoramento de perdas durante todas as etapas envolvidas. A recuperação obtida é reportada como a medida do efeito de matriz e erro analítico, mas não é utilizada para fazer ajustes nas concentrações de acordo com recomendações da U.S EPA (2002). Não se deve confundir o subrogado com os padrões internos também deuterados, já que estes últimos são adicionados no último passo analítico e são utilizados na análise quantitativa para corrigir a variabilidade instrumental entre amostras; a área do pico do padrão interno na amostra é comparada com a área do pico do analito (LESAGE, 1992). Neste trabalho o subrogado foi utilizado nas curvas analíticas para a avaliação da recuperação obtida nos testes de validação e nas amostras de água de rio.

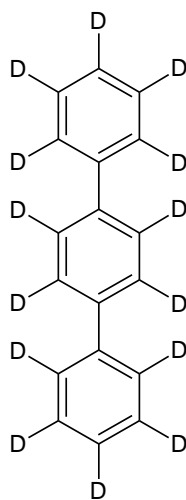


FIGURA 17 – ESTRUTURA MOLECULAR DO SUBROGADO P-TERFENIL- $\text{D}_{14}$   
FONTE: A AUTORA

A regressão linear de todas as curvas foi obtida a partir da plotagem da razão entre as áreas do pico do HPA e as áreas do pico do padrão interno em relação à razão entre as concentrações dos HPA e dos padrões internos correspondentes. As respostas da curva analítica instrumental apresentaram uma resposta linear em todo o intervalo de trabalho, sendo verificada por meio do coeficiente de correlação cujos valores estiveram na faixa de 0,991 a 0,997 exceto para o dibenzo[a,h]antraceno cujo valor foi de 0,986. Já na curva obtida pós-extração, as linearidades diminuíram significativamente para os compostos de menor massa molecular, resultando em desvios maiores para todos eles, como no caso do naftaleno e do acenafteno com coeficientes de correlação de 0,880 e 0,861, respectivamente, e concordante com resultados obtidos na literatura (BASHEER et al., 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica, pois o método da razão sinal-ruído pode afetar seus valores devido às flutuações dos picos cromatográficos. Deste modo, o método escolhido garante uma maior confiabilidade estatística, como mencionado anteriormente. Os dados das curvas analíticas dos 16 HPA e do p-terfenil-d<sub>14</sub> são apresentados nas TABELAS 26 e 27.

TABELA 26 – FIGURAS DE MÉRITO DOS HPA OBTIDOS A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA INSTRUMENTAL

HPA	<sup>3</sup> Intervalo linear (µg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	*%DPR para 10 µg L <sup>-1</sup>	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )
Naftaleno	10 - 400	0,998	2,30	0,0036	0,0121
Acenaftileno	10 - 400	0,995	1,95	0,0085	0,0284
Acenafteno	10 - 400	0,997	2,07	0,0061	0,0203
Fluoreno	10 - 400	0,996	2,54	0,0061	0,0203
Fenantreno	10 - 400	0,996	1,48	0,0173	0,0577
Antraceno	10 - 400	0,993	3,85	0,0136	0,0455
Fluoranteno	10 - 400	0,995	4,22	0,0072	0,0240
Pireno	10 - 400	0,997	1,74	0,0118	0,0394
Benzo[a]antraceno	10 - 400	0,995	5,73	0,0123	0,0410
Criseno	10 - 400	0,998	4,58	0,0131	0,0439
Benzo[b]fluoranteno	10 - 400	0,996	3,20	0,0232	0,0774
Benzo[k]fluoranteno	10 - 400	0,997	3,60	0,0194	0,0647
Benzo[a]pireno	10 - 400	0,991	3,86	0,0142	0,0473
Indeno[1,2,3-cd]pireno	10 - 335	0,987	2,72	0,0082	0,0275
Dibenzo[a,h]antraceno	10 - 335	0,984	50,48	0,1267	0,4224
Benzo[g,h,i]perileno	10 - 400	0,992	1,35	0,0220	0,0734
p-terfenil-d <sub>14</sub>	10 - 335	0,971	5,15	0,1662	0,5542

\*O % DPR corresponde às áreas obtidas dos HPA com (n=3)

<sup>3</sup> Cada concentração foi dividida pela concentração do padrão interno (204,8 µg L<sup>-1</sup>)

TABELA 27 – FIGURAS DE MÉRITO DOS HPA OBTIDOS A PARTIR DA CURVA ANALÍTICA PÓS-EXTRAÇÃO

HPA	<sup>3</sup> Intervalo linear (µg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	*%DPR para 0,001 µg L <sup>-1</sup>	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )
Naftaleno	0,001-1	0,880	17,40	0,0011	0,0037
Acenaftileno	0,001-1	0,996	22,63	0,0006	0,0018
Acenafteno	0,001-10	0,861	72,05	0,0099	0,0330
Fluoreno	0,001-10	0,985	74,86	0,0024	0,0079
Fenantreno	0,001-10	0,999	114,15	0,0038	0,0126
Antraceno	0,001-10	0,999	35,65	0,0042	0,0141
Fluoranteno	0,001-10	0,995	101,11	0,0067	0,0224
Pireno	0,001-10	0,997	134,73	0,0054	0,0178
Benzo[a]antraceno	0,001-10	0,938	7,25	0,0191	0,0638
Criseno	0,001-10	0,932	74,30	0,0211	0,0704
Benzo[b]fluoranteno	0,001-10	0,912	78,11	0,0253	0,0844
Benzo[k]fluoranteno	0,001-10	0,907	61,66	0,0224	0,0748
Benzo[a]pireno	0,001-10	0,935	63,96	0,0187	0,0624
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,001-10	0,983	62,50	0,0097	0,0325
Dibenzo[a,h]antraceno	0,001-10	0,991	48,00	0,0072	0,0239
Benzo[g,h,i]perileno	0,001-10	0,987	45,55	0,0056	0,0187
p-terfenil-d <sub>14</sub>	0,001-10	0,880	25,90	0,0317	0,1055

\*O % DPR corresponde às áreas obtidas dos HPA com (n=3)

<sup>3</sup> Cada concentração foi dividida pela concentração do padrão interno (100 µg L<sup>-1</sup>)

Partindo-se do fato de que os HPA normalmente são encontrados em baixas concentrações nos corpos de água naturais, o método deve ter baixos LOD como os obtidos no presente trabalho. Pode se observar os resultados satisfatórios para ambas curvas analíticas, sem diferenças significativas entre os LOD e LOQ. Nesse sentido, o método desenvolvido deverá ter elevados fatores de enriquecimento para os compostos alvo, especialmente para aqueles legislados. Para os testes de precisão os fatores de enriquecimento deverão ser independentes da concentração da amostra, em vista de que a concentração dos HPA no ambiente não é conhecida. Se o método é independente da concentração da amostra significa que os valores de enriquecimento deverão ser constantes em qualquer concentração; portanto a quantidade extraída na fase receptora seria diretamente proporcional à quantidade presente na amostra (NOKWETHEMBA, 2012).

Considerando que os HPA geralmente estão presentes em concentrações sob a ordem de µg L<sup>-1</sup>, as recuperações do método devem ser avaliadas através do enriquecimento de amostras de água ultrapura com soluções padrão de HPA e subrogado, para atingir concentrações de 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg L<sup>-1</sup> no meio aquoso. Os fatores de enriquecimento e as recuperações após as extrações foram calculadas usando o método do padrão interno e a



curva analítica instrumental (KING et al., 2002), conforme as equações 6 e 7. Os resultados obtidos são detalhados na TABELA 28 e representados graficamente na FIGURA 18:

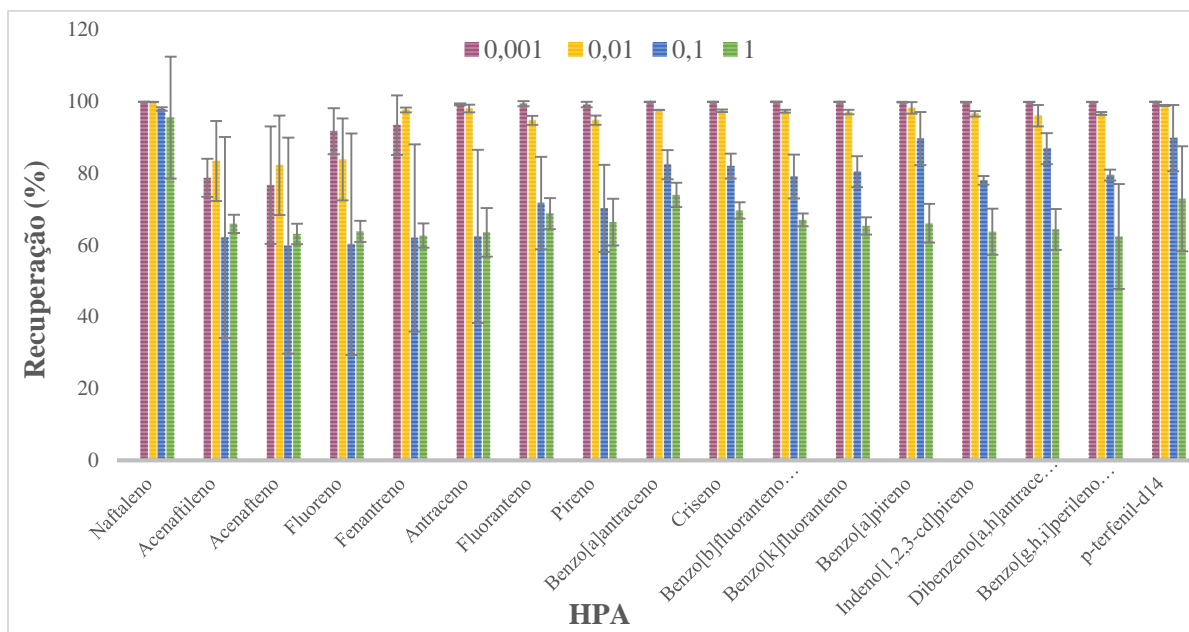


FIGURA 18 – RECUPERAÇÕES DOS HPA E DO P-TERFENIL-D<sub>14</sub> E SEUS RESPECTIVOS % DPR PARA QUATRO CONCENTRAÇÕES DIFERENTES EM ÁGUA ULTRAPURA

TABELA 28 – FATORES DE ENRIQUECIMENTO E RECUPERAÇÕES OBTIDAS EM QUATRO CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DESVIOS RELATIVOS EM ÁGUA ULTRAPURA

HPA	* $\Phi$ Concentração avaliada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )											
	0,001			0,01			0,1			1		
	F.E	%R	%DPR	F.E	%R	%DPR	F.E	%R	%DPR	F.E	%R	%DPR
Naftaleno	400	99,94	0,01	400	99,90	0,02	392	97,93	0,5	382	95,53	0,1
Acenaftileno	327	78,72	5,31	334	83,44	9,29	248	62,11	28,0	264	65,92	1,2
Acenafteno	311	76,69	16,4	329	82,52	11,41	239	59,81	30,1	252	63,10	1,1
Fluoreno	373	91,77	6,4	335	83,88	11,4	241	60,27	30,1	255	63,84	4,2
Fenantreno	386	93,41	8,3	391	97,70	0,66	248	62,01	26,1	251	62,66	1,1
Antraceno	397	99,20	0,2	392	98,05	1,06	250	62,42	24,1	254	63,58	5,0
Fluoranteno	395	99,43	0,7	379	94,76	1,21	287	71,71	12,9	275	68,81	5,7
Pireno	394	99,15	0,7	379	94,81	1,32	281	70,24	12,1	266	66,40	2,2
Benzo[a]antraceno	386	99,95	0,03	391	97,65	0,04	330	82,42	3,3	296	73,97	1,5
Criseno	400	99,95	0,03	390	97,45	0,4	328	82,04	2,8	279	69,65	0,6
Benzo[b]fluoranteno	400	99,94	0,06	389	97,30	0,4	316	79,11	6,1	268	67,03	1,6
Benzo[k]fluoranteno	399	99,96	0,03	388	98,07	0,6	322	80,43	4,3	261	65,36	1,0
Benzo[a]pireno	398	99,85	0,1	393	98,24	1,6	359	89,66	7,4	264	66,07	3,5
Indeno[1,2,3-cd]pireno	398	99,87	0,09	386	96,61	0,7	312	78,03	1,2	255	63,73	7,4
Dibenzo[a,h]antraceno	398	99,91	0,03	384	96,10	2,81	347	86,88	4,3	257	64,33	6,8
Benzo[g,h,i]perileno	398	99,91	0,05	384	96,69	3,0	318	79,52	1,5	250	62,42	5,6
p-terfenil-d14	399	99,98	0,005	387	98,90	0,4	359	89,84	9,2	292	72,91	14,6

\*n=3

$\Phi V_i=14 \mu\text{L}$  (evaporação e reconstituição em  $50 \mu\text{L}$ ) e  $V_d=20\text{mL}$

De acordo com os resultados obtidos, é possível reconhecer uma tendência decrescente tanto das recuperações quanto dos fatores de enriquecimento em função do aumento da concentração. Porém, segundo Nokwethemba (2012), raramente variam os fatores de enriquecimento quando utilizados um ou dois níveis de concentração próximos ao que é esperado em amostras ambientais. Portanto, é possível lhes atribuir essa diminuição a fatores relacionados com o equilíbrio termodinâmico da extração, tais como a difusão incompleta dos analitos no meio aquoso, volatilidade dos compostos e/ou o reduzido volume de tolueno (relacionado com o tamanho da fibra oca), além de possíveis perdas por volatilidade devidas a seu armazenamento no *freezer* durante vários dias para sua consequente determinação por GC-MS. É importante lembrar que os HPA são fotossensíveis (U.S.EPA, 1996), o que conduz a uma provável degradação ao cabo de alguns dias. Entretanto, cabe salientar que a razão entre os volumes da fase receptora (14  $\mu\text{L}$ ), sua evaporação e reconstituição em diclorometano (50  $\mu\text{L}$ ) junto com o volume da fase doadora (20 mL) providenciou fatores de enriquecimento muito altos para todos os HPA, quando comparados aos obtidos na literatura (TABELA 29).

Por outro lado, as faixas de recuperação obtidas para os HPA (59,81-99,96 %) para uma concentração de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,001  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, mostraram uma menor recuperação para aqueles HPA com menor massa molecular como o acenaftileno e o acenafteno. Diante destes resultados, evidencia-se uma boa recuperação do subrogado (>70 %) em todas as concentrações, garantindo uma eficiência considerável no intervalo estudado para o método proposto, salientando que para a grande maioria foram obtidos valores satisfatórios.

O método de HF-LPME forneceu fatores de enriquecimento maiores aos reportados na literatura em vista da razão de volumes da fase receptora (14  $\mu\text{L}$ ) e doadora (20 mL), e LOD similares a pesquisas envolvendo a mesma matriz e o mesmo solvente orgânico, segundo os dados apresentados na TABELA 29.

TABELA 29 – CONDIÇÕES DE MÉTODOS DESENVOLVIDOS NA LITERATURA PARA DETERMINAR HPA COM HF-LPME E GC-MS

Amostra	Solvente orgânico	Volumes	Fibra (cm)	NaCl (%m/v)	t (min)	F.E	LOD	Referência
Solo	Octano	Vr = 4 µL Vd = 22 mL	6,5	–	8	165,8 - 233,5	0,13- 0,22 mgKg <sup>-1</sup>	King et al., 2002
Água de chuva	Tolueno	Vr = 5 µL Vd = 5 mL	1,3	30	35	46- 167	0,006- 0,040 µgL <sup>-1</sup>	Basheer et al., 2003
Água Residual	Tolueno	Vr = 3 µL Vd = 5 mL	1,3	2,5	15	–	0,006- 0,011 µgL <sup>-1</sup>	Charalabaki et al., 2005
Água ultrapura	Tolueno	Vr = 30 µL Vd = 250 mL	10,8	–	10	494- 4555	2-120 ngL <sup>-1</sup>	Wang et al., 2006
Água de rio	Heptano	Vr = 17 µL Vd = 20 mL	5,0	–	30	40-82	0,025- 0,097 µgL <sup>-1</sup>	Nokwethemba, 2012
Água de rio	Tolueno	Vr = 17 µL Vd = 20 mL	5,0	2,5	10	239- 399	0,0006- 0,0253 µgL <sup>-1</sup>	Presente trabalho

Vr: Volume da fase receptora (orgânica) Vd= Volume da fase doadora (aquosa)

A determinação da precisão do método proposto foi avaliada através da precisão intra-corrida (repetitividade) e da precisão inter-corrida, as quais foram verificadas a partir de nove determinações (três repetições em três níveis diferentes) realizadas em um e dois dias, respectivamente, sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos com base na estimativa do desvio padrão relativo % DPR calculado através dos valores de recuperação, previamente discutidos acima, em função de considerar o desvio contido na razão dos volumes, anteriormente dilucidados. Abaixo se apresentam os resultados correspondentes:

TABELA 30 – VALORES DE PRECISÃO INTRA-CORRIDA (%) E PRECISÃO INTER-CORRIDA (%) EM TRÊS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES EM ÁGUA ULTRAPURA

HPA	*Concentração avaliada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0,01		0,1		1	
	$\phi\text{P}_{\text{intra}}$ (%)	$\textcircled{3}\text{P}_{\text{inter}}$ (%)	$\phi\text{P}_{\text{intra}}$ (%)	$\textcircled{3}\text{P}_{\text{inter}}$ (%)	$\phi\text{P}_{\text{intra}}$ (%)	$\textcircled{3}\text{P}_{\text{inter}}$ (%)
Naftaleno	0,02	1,02	0,47	1,01	0,11	6,18
Acenaftileno	11,13	46,03	27,98	28,97	1,16	38,97
Acenafteno	13,87	49,12	30,10	30,72	1,14	38,70
Fluoreno	11,45	39,52	30,88	38,35	4,24	34,81
Fenantreno	0,66	30,78	26,07	34,42	1,11	30,42
Antraceno	1,06	22,83	24,13	49,01	5,01	17,80
Fluoranteno	1,21	2,57	12,92	19,01	5,75	8,96
Pireno	1,32	6,02	12,14	23,25	2,20	34,22
Benzo[a]antraceno	0,04	0,60	4,06	11,58	1,53	9,84
Criseno	0,36	0,62	3,47	11,54	0,63	4,60
Benzo[b]fluoranteno	0,39	0,80	6,08	9,46	1,59	6,01
Benzo[k]fluoranteno	0,63	0,88	4,32	8,91	0,99	16,02
Benzo[a]pireno	1,57	1,15	7,41	9,82	3,55	15,28
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,72	0,65	1,21	19,09	7,42	15,54
Dibenzo[a,h]antraceno	2,97	2,02	4,32	16,52	6,76	24,40
Benzo[g,h,i]perileno	0,40	0,45	1,51	8,85	5,58	19,31
p-terfenil-d14	0,12	0,26	9,21	8,72	14,62	11,67

\*n=3

 $\phi$ Precisão intra-corrida $\textcircled{3}$ Precisão inter-corrida

Os desvios padrões relativos dos HPA para a precisão intra-corrida variaram de 0,02 a 11,41 % para uma concentração de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ , de 0,5 a 30,1 % para 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e de 0,1 a 7,4 % para 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . No caso da precisão inter-corrida os desvios padrões relativos ficaram entre os valores de 0,45 e 49,12 % para 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ , entre 1,01 e 49,01 % para 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e entre 4,6 e 38,97 % para 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Assim, pode se observar um maior desvio para aqueles com menor massa molecular e uma tendência inversa naqueles com massas maiores do que os isômeros fenantreno e antraceno. Este fato tem a ver com a disposição dos primeiros compostos a co-eluir com maior facilidade do que os últimos compostos, prejudicando a integração das áreas dos mais leves. Aqueles com maiores massas moleculares apresentaram valores satisfatórios, considerando que em análise de traços ou impurezas são aceitos % DPR de até 30% segundo a AOAC International (TAVERNIERS et al., 2004).

#### 4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS REAIS DE RIO

O método otimizado de HF-LPME foi aplicado à extração de HPA em amostras reais dos rios Belém, Iguaçu e Irai para depois ser determinado por GC-MS. Neste trabalho não foi desenvolvido um planejamento amostral, no qual são consideradas variações espaciais e temporais, por não se tratar de um estudo de monitoramento (BESSA et al., 2013). Os pontos dos rios amostrados são representantes simples da presença de HPA nas camadas superficiais dos seus corpos hídricos. A TABELA 31 compila algumas propriedades físico-químicas (pH e condutividade) das amostras:

TABELA 31 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA EM AMOSTRAS DE RIO

Amostras	pH	*Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Rio Belém	8,32	276
Rio Iguaçu	7,22	47,0
Rio Irai	7,42	53,3

\*Medida a uma temperatura de 25 °C

Os pH das amostras apresentaram valores próximos à alcalinidade, o que quer dizer que uma maior quantidade de íons de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) reagiu com outros compostos presentes na água, deixando mais íons de hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) no meio. Deste modo, a relação entre um pH alcalino (8,32) e uma alta condutividade ( $276 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) para o rio Belém, pode ser associada à presença de resíduos sólidos que contribuem com fosfatos, sulfatos e ânions. A natureza das camadas superficiais dos rios é diferente a das suas colunas de água estagnadas, assim as concentrações de HPA são distintas no grau da presença destes poluentes (NOKWETHEMBA, 2012).

Com o objetivo de avaliar os efeitos de matriz sobre a extração foi investigada a aplicabilidade do presente método em amostras de água de rio. Para isso foram feitos testes de recuperação mediante a fortificação em três concentrações diferentes, os resultados dos HPA e do subrogado nos três rios estão apresentados nas TABELAS 32, 33 e 34 e representados graficamente nas FIGURAS 19, 20 e 21.

TABELA 32 – RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO BELÉM (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)

Rio Belem HPA	Concentração avaliada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0,01		0,05		0,1*	
	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)
Naftaleno	99,78	0,05	71,17	66,70	26,44	38,15
Acenaftileno	43,46	28,50	22,60	41,74	39,59	119,36
Acenafteno	70,01	16,76	21,89	73,29	22,39	58,84
Fluoreno	48,06	17,28	20,22	16,98	12,74	51,37
Fenantreno	99,60	0,72	71,62	4,14	89,26	1,04
Antraceno	99,54	0,19	92,47	0,65	95,79	0,43
Fluoranteno	75,28	3,86	44,03	9,63	31,36	7,16
Pireno	67,70	4,74	45,38	9,66	26,40	28,75
Benzo[a]antraceno	86,30	4,51	60,91	7,11	49,75	11,22
Criseno	90,71	1,39	73,09	0,97	53,04	4,09
Benzo[b]fluoranteno	88,77	0,88	52,82	7,44	48,47	4,34
Benzo[k]fluoranteno	88,30	7,95	69,08	5,88	58,84	3,30
Benzo[a]pireno	84,47	4,36	43,24	15,57	43,95	5,99
Indeno[1,2,3-cd]pireno	90,84	0,11	28,41	13,77	50,62	6,67
Dibenzo[a,h]antraceno	88,26	0,77	53,46	10,67	43,26	9,55
Benzo[g,h,i]perileno	88,59	2,42	67,85	7,05	49,85	3,92
p-terfenil-d <sub>14</sub>	82,83	5,14	38,93	15,09	37,66	45,27

\*n=2

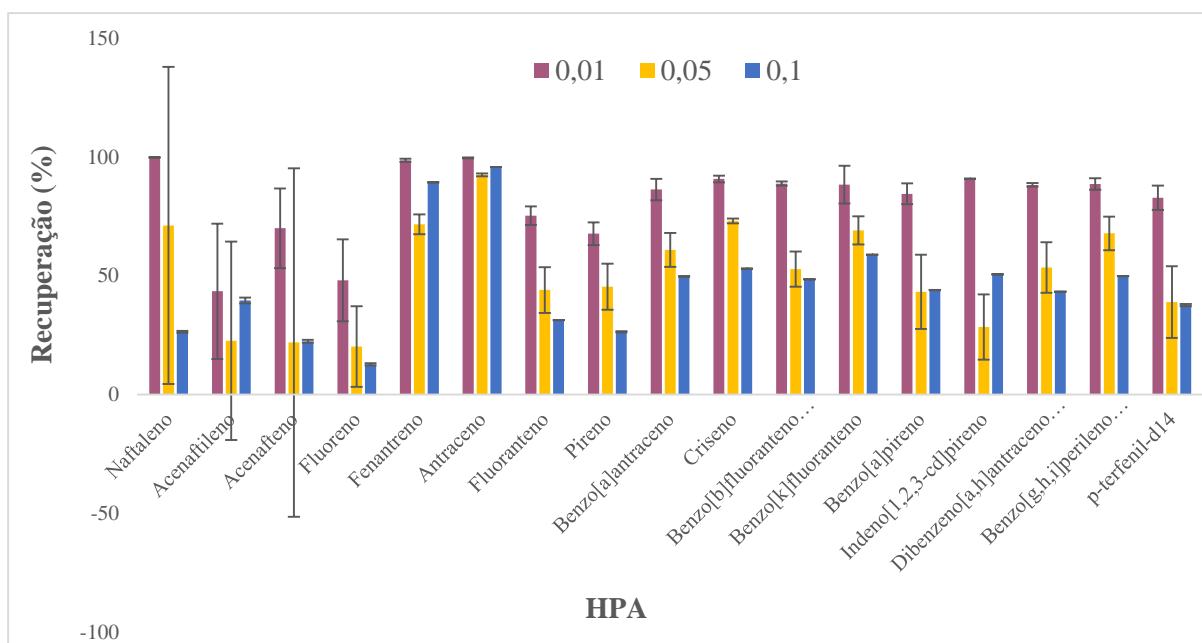


FIGURA 19 – RECUPERAÇÕES OBTIDAS E SEUS % DPR PARA O RIO BELÉM EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS

TABELA 33 – RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IGUAÇU (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)

Rio Iguaçu HPA	Concentração avaliada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0,01		0,05		0,1	
	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)
Naftaleno	82,14	17,94	97,81	1,01	97,72	0,08
Acenaftileno	57,26	19,13	27,29	32,18	18,73	18,59
Acenafteno	79,76	1,83	41,15	45,91	19,16	46,65
Fluoreno	49,69	32,42	24,79	33,11	15,01	40,43
Fenantreno	99,41	0,07	83,16	12,17	82,57	1,79
Antraceno	99,79	0,05	94,95	3,00	93,45	0,62
Fluoranteno	79,89	9,42	45,51	13,47	35,85	6,10
Pireno	73,41	11,88	46,58	16,48	34,81	10,99
Benzo[a]antraceno	89,27	8,19	63,70	6,22	54,98	0,45
Criseno	91,34	2,77	72,86	4,55	59,98	4,35
Benzo[b]fluoranteno	90,80	3,69	57,35	15,03	53,25	10,06
Benzo[k]fluoranteno	93,64	3,44	68,24	5,47	66,75	1,20
Benzo[a]pireno	83,16	14,74	48,51	11,20	47,58	13,74
Indeno[1,2,3-cd]pireno	85,04	13,61	42,94	29,20	61,11	13,83
Dibenzo[a,h]antraceno	88,69	5,66	64,04	7,32	67,38	10,29
Benzo[g,h,i]perileno	92,38	3,18	70,14	6,81	71,40	4,52
p-terfenil-d <sub>14</sub>	80,17	12,97	53,65	14,33	55,18	1,55

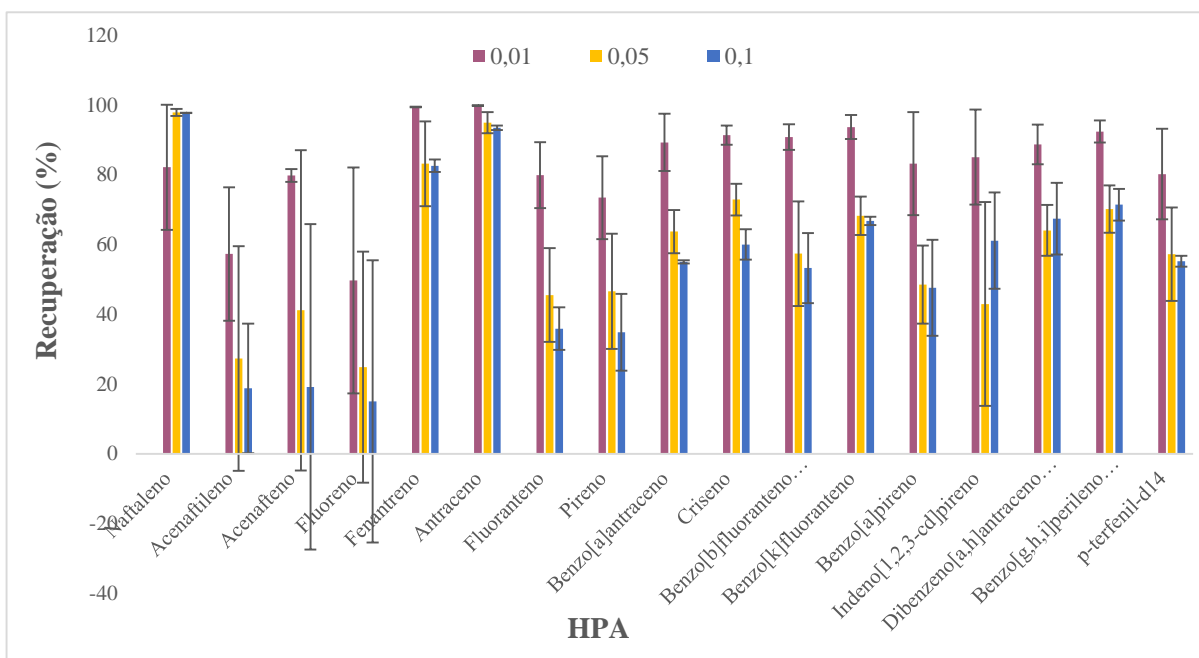


FIGURA 20 – RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O RIO IGUAÇU E SEUS %DPR EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS



TABELA 34 – RECUPERAÇÕES DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IRAI (N=3) FORTIFICADAS EM 3 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)

Rio Irai	Concentração avaliada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	0,01		0,05		0,1	
	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)	R (%)	DPR(%)
Naftaleno	99,77	0,02	83,13	32,55	82,95	26,61
Acenaftileno	53,56	5,96	28,61	43,07	19,14	49,07
Acenafteno	55,58	8,08	26,95	29,27	21,80	45,91
Fluoreno	52,33	10,23	25,45	34,48	21,67	41,45
Fenantreno	96,19	4,73	85,71	6,72	78,50	14,95
Antraceno	99,12	0,82	95,64	1,87	93,40	3,30
Fluoranteno	80,77	9,24	44,57	3,37	43,30	11,34
Pireno	75,97	2,06	46,83	17,31	39,03	5,20
Benzo[a]antraceno	89,03	3,83	65,62	5,43	55,58	7,56
Criseno	93,50	1,26	71,03	3,77	55,03	1,55
Benzo[b]fluoranteno	85,51	4,93	59,49	3,88	47,13	11,35
Benzo[k]fluoranteno	92,53	2,31	70,02	4,32	58,43	5,68
Benzo[a]pireno	86,30	1,36	52,98	17,00	45,00	13,06
Indeno[1,2,3-cd]pireno	84,13	6,82	40,19	8,82	31,57	20,54
Dibenzo[a,h]antraceno	93,02	0,89	63,56	7,52	52,22	12,18
Benzo[g,h,i]perileno	92,58	1,96	70,93	1,32	56,59	6,49
p-terfenil-d <sub>14</sub>	86,07	9,75	56,44	18,24	62,95	4,80

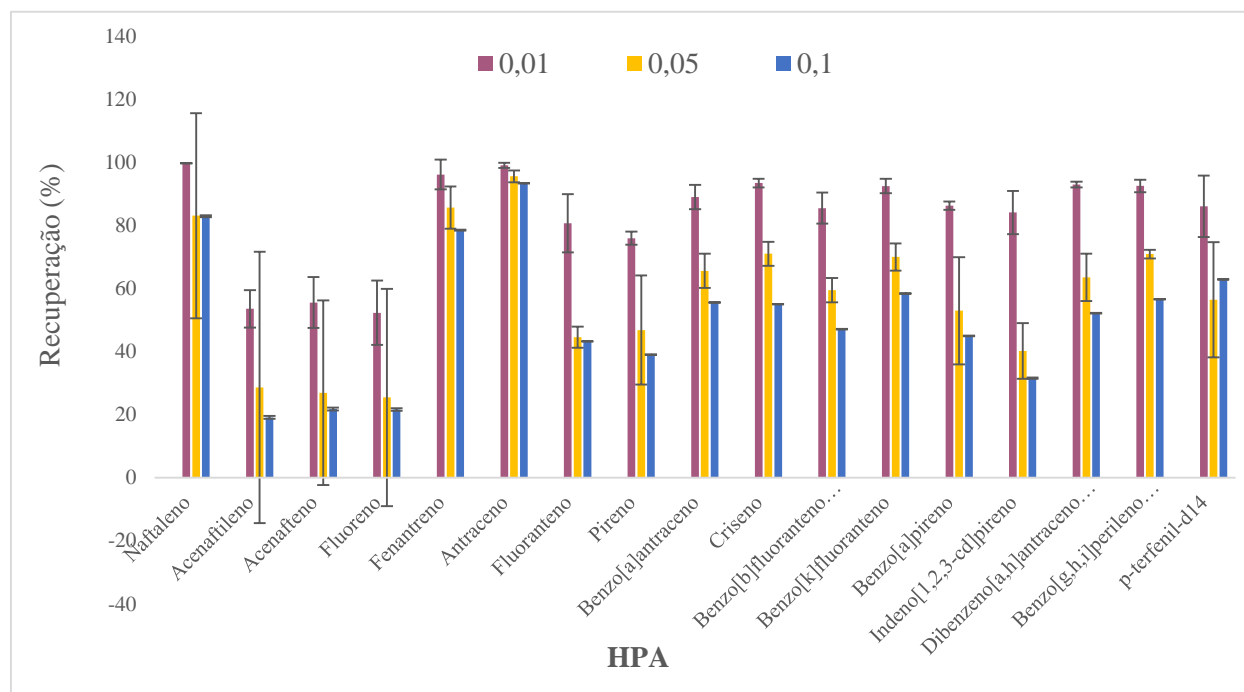


FIGURA 21 – RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O RIO IRAI E SEUS % DPR EM TRÊS CONCENTRAÇÕES FORTIFICADAS

De acordo com os resultados em termos gerais, pode-se verificar uma relativa diminuição das recuperações em água de rio quando comparados com as recuperações em água ultrapura, especialmente para os HPA de menor massa molecular. Esta situação reflete o efeito de outros componentes da matriz, observados no perfil cromatográfico da FIGURA 22, aumentando o ruído instrumental nos primeiros compostos a eluir, o que dificultou a integração das áreas dos picos correspondentes, além da significativa baixa intensidade das respostas.

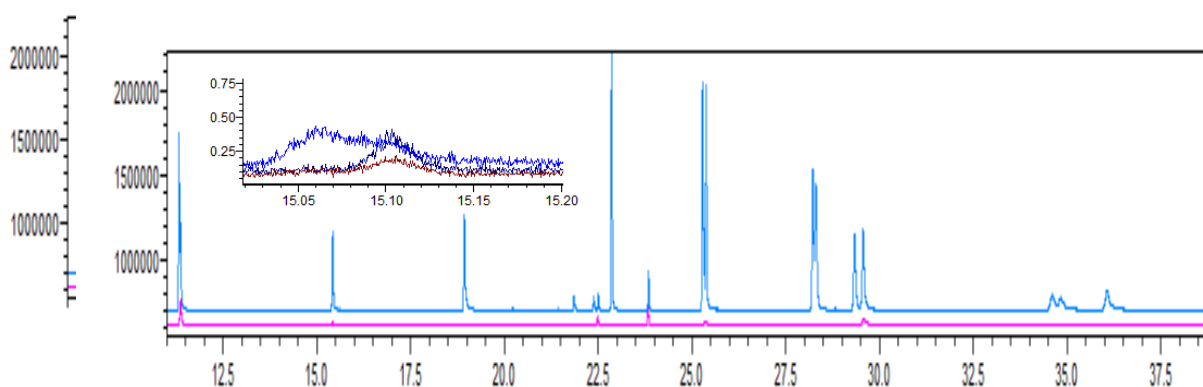


FIGURA 22: SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS DAS EXTRAÇÕES EM ÁGUA DO RIO IRAI (COR ROSA) E ÁGUA ULTRAPURA (COR AZUL)

Entretanto, a determinação cromatográfica com espectrometria de massas permitiu a identificação e determinação adequada dos HPA em estudo. Particularmente quando fortificados com uma concentração de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , foi possível obter dados satisfatórios para os três rios, considerando a complexidade própria da determinação de concentrações traço de compostos orgânicos em matrizes ambientais. Isto pode ser comprovado graças à boa recuperação do composto p-terfenil- $\text{d}_{14}$ , a qual encontrou-se na faixa de 80–86 %. No entanto, recuperações menores são apresentadas conforme aumentam as fortificações a  $0,05$  e  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , observando para os três rios um maior desvio no caso da concentração  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este decréscimo das recuperações associado às maiores concentrações se repete quando é empregada água ultrapura como matriz, tal e como foi discutido acima. As FIGURAS 23 e 24 compara as recuperações entre água ultrapura e os rios Belém, Iguaçu e Irai.

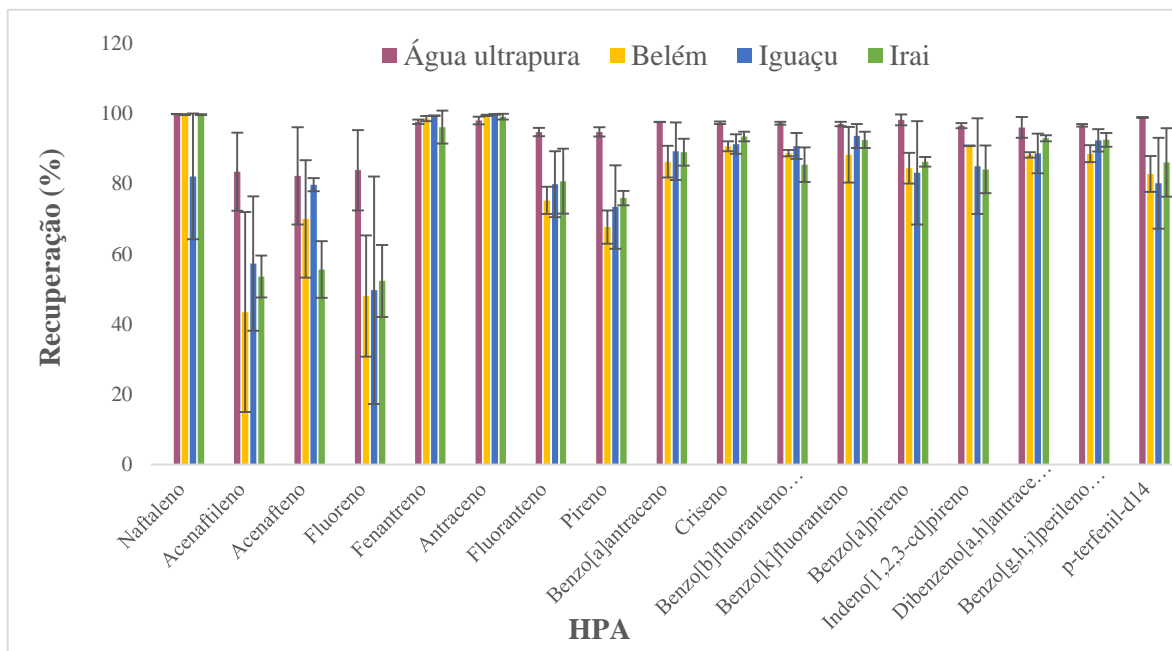


FIGURA 23: COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÕES ENTRE ÁGUA ULTRAPURA E OS RIOS BELÉM, IGUAÇU E IRAI COM SEUS % DPR, FORTIFICADAS COM 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  DE HPA E P-TERFENIL- $\text{D}_{14}$

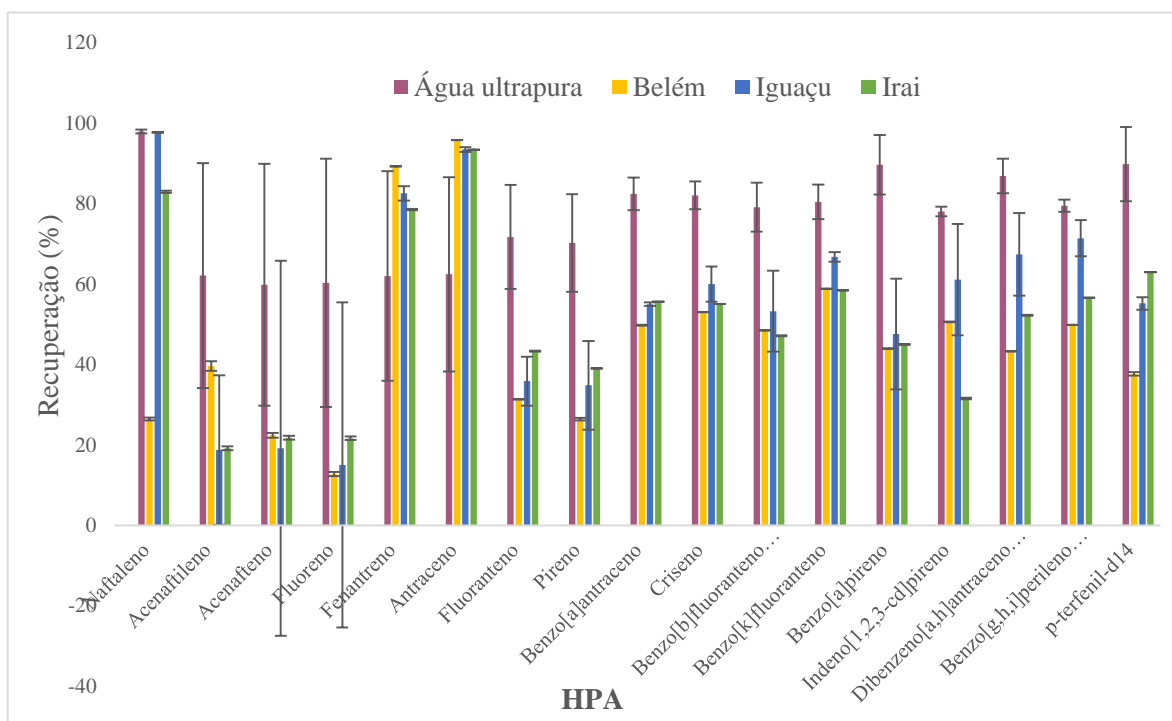


FIGURA 24: COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÕES ENTRE ÁGUA ULTRAPURA E OS RIOS BELÉM, IGUAÇU E IRAI COM SEUS % DPR, FORTIFICADAS COM 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  DE HPA E P-TERFENIL- $\text{D}_{14}$

Dado que a HF-LPME é uma técnica de equilíbrio, as competições das adsorções dos sólidos suspensos no meio aquoso podem reduzir a concentração efetiva dos analitos na fase aquosa e, portanto, diminuir a quantidade de analito transferida à fase orgânica (CHARALABAKI et al., 2005). Esta situação evidencia a contribuição da matéria orgânica suspensa presente nas matrizes de água natural, nas quais são obtidas menores recuperações e desvios maiores quando comparadas com água ultrapura. Contudo, é assumido o equilíbrio dos HPA com o conteúdo uniforme de sólidos suspensos nas colunas de água natural, o que explica o reduzido efeito de matriz, já que a HF-LPME é sensível somente aos HPA dissolvidos no meio aquoso e não àqueles aderidos aos sólidos suspensos.

As perdas de HPA por vaporização no caso dos compostos com maiores constantes da lei de Henry (mais voláteis) podem ser facilmente evitadas, ao garantir uma completa ocupação do volume do *vial*. Por tanto estas perdas por volatilização são mais fáceis de prevenir do que aquelas que ocorrem devido à presença de sólidos suspensos no meio, mais difíceis de controlar (CHARALABAKI et al., 2005).

De tal forma, os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios demonstrando que o método de extração otimizado apresenta precisão e exatidão adequadas para a determinação de HPA em amostras de água de rio, superando o maior desafio dentro dos diferentes tipos de águas doces naturais.

Finalmente foram calculadas as concentrações finais nas amostras de água, por meio da equação 29, correspondente ao método do padrão interno, na qual o fator de resposta correspondeu à inclinação da curva analítica de pós-extração. Cabe lembrar que a concentração final deve ser multiplicada pelo fator de diluição correspondente à razão dos volumes da HF-LPME, isto é:

$$\text{Fator de diluição} = \frac{V_{\text{org}}}{V_{\text{aq}}} = \frac{0,00005 \text{ L}}{0,02 \text{ L}} \quad (29)$$

TABELA 35 – CONCENTRAÇÕES ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) DOS HPA OBTIDAS COM HF-LPME PARA AMOSTRAS REAIS DE RIO (N=3) COM SEUS RESPECTIVOS DPR (%)

HPA	Rio Belém		Rio Iguaçu		Rio Irai	
	Conc.	DPR	Conc.	DPR	Conc.	DPR
Naftaleno	< LOQ	-	< LOQ	-	< LOQ	-
Fenantreno	< LOQ	-	< LOQ	-	< LOQ	-
Antraceno	0,035	57,13	< LOQ	-	< LOQ	-

Os HPA faltantes foram determinados em concentrações menores aos LOD

A aplicação do método nas localidades anteriormente especificadas dos rios Belém, Iguaçu e Irai resultou na presença do antraceno como o único HPA dos 16 estudados. A concentração deste composto no rio Belém foi de  $0,035 \mu\text{g L}^{-1}$ , como era presumido por estar situado em uma região altamente urbanizada. Esta bacia sofre muitos desequilíbrios ambientais, cujas principais causas são a precária infraestrutura de esgotamento sanitário, o desmatamento, a presença de lixo, as ocupações irregulares nas margens, o confinamento do leito do rio, a impermeabilização do solo devido à urbanização, entre outras (SUDERHSA, 1998).

Em contrapartida, os rios Iguaçu e Irai apresentaram concentrações menores aos LOQ, provavelmente devido a seus grandes maciços florestais e por suas bacias contarem com atividades econômicas que representam menores fontes de contaminação de HPA. De acordo com estudo realizado por Leite (2008), os HPA de 5 e 6 anéis aromáticos são predominantes nos sedimentos do rio Iguaçu, pois possuem uma maior afinidade polar com este tipo de matriz, além de que estes compostos são mais frequentes em sedimentos de regiões urbanas, vinculado às atividades antrópicas. Isto ocorre inversamente com os HPA de 2-4 anéis, já que estes são mais solúveis em água, podendo ser transportados até as camadas superficiais dos corpos hídricos.

No caso do rio Irai com sua bacia de  $111,78 \text{ km}^2$ , protegida por sua Área de Proteção Ambiental e uma área vegetada de mata remanescente de aproximadamente 51% (CURCIO et al., 2007), era esperado que apresentasse concentrações consideravelmente baixas de HPA como comprovado através da determinação proposta.

Como foi dito acima, o presente estudo não forma parte de um monitoramento espacial ou temporal, razão pela qual estas concentrações devem ser interpretadas como aplicações pontuais sem pertinência legal, mesmo situando tal concentração sob os limites permitidos pela Resolução CONAMA n° 357 (2005) de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Porém, estas concentrações são

condizentes com as reportadas por Zhang et al (2012) de  $0,0088 \mu\text{g L}^{-1}$  para o antraceno no rio Yangtze na China, de  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$  no rio Luyanó na Cuba (SANTANA-ROMERO et al., 2012) e de  $0,0085 \mu\text{g L}^{-1}$  no rio Mississippi nos Estados Unidos (ZHANG et al., 2007).

Finalmente, as recuperações do padrão subrogado foram de 78,88 %, 82,64 % e de 75,69 % para os rios Belém, Iguaçu e Irai, respectivamente, garantindo confiabilidade analítica aos resultados apresentados, com valores maiores aos sugeridos para determinações em concentrações traço (>40%).

## 5. CONCLUSÕES

A análise exaustiva dos principais parâmetros operacionais da extração em estudo (HF-LPME), permitiu a otimização de um método para a identificação e detecção dos 16 HPA prioritários em águas naturais. Diante do exposto, evidenciou-se como os planejamentos fatoriais permitiram reconhecer importantes interações entre os principais fatores para a identificação das melhores condições, a partir de um número reduzido de experimentos. Este estudo pioneiro de otimização com planejamento fatorial como ferramenta estatística em água doce superficial, forneceu fatores de enriquecimento significativamente maiores aos reportados na literatura, assim como alta seletividade e eficiência de extração.

De tal modo, todos os aspectos de relevância para o estabelecimento e avaliação da HF-LPME, foram possíveis graças ao método instrumental otimizado. A HF-LPME implica vantagens como altos fatores de enriquecimento e seletividade, baixo consumo de reagentes, eliminação do efeito de memória devido ao caráter descartável da fibra além de ser pouco onerosa e rápida. Esta última característica a coloca à disposição de análises rotineiras laboratoriais.

É importante salientar como os resultados obtidos contribuem à aplicação desta metodologia para a determinação de compostos encontrados em níveis traços em diversas matrizes ambientais. Dada a ampla variedade de matrizes nas quais a HF-LPME é aplicada, deve-se destacar a relevância da otimização efetuada mediante planejamentos fatoriais, como ferramenta estatística para a determinação das melhores condições do sistema analito-matriz.

A avaliação da extração otimizada, mediante a determinação de recuperações, fatores de enriquecimento e figuras de mérito através das curvas analíticas providenciou dados pertinentes, como a precisão e exatidão satisfatórias que evidenciam a melhoria da técnica de HF-LPME já consolidada, para a determinação simultânea de 16 poluentes.

Os resultados obtidos da aplicação do método em amostras de água de rio proporcionaram a comprovação da efetividade da HF-LPME para a determinação de HPA em águas doces superficiais, verificando um baixo efeito de matriz na determinação dos compostos com maior massa molecular em concentrações traço.

Por fim, visa-se o desenvolvimento de uma automatização da técnica que promova a redução das dificuldades operacionais comumente presentes nas técnicas miniaturizadas de extração, como alternativa aos desafios do método apresentado.

## REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9898, 1987.
- ALVES, F.; CASTRO, M.M.; CAMPILONGO, M.S.; RODRIGUES DA SILVA, L.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, Vol. 31. No.1, 2008.
- ANDERSON, R. *The Cosmic Compendium: Interstellar Travel*, 2015.
- ANDERSSON, J.; ACHTEN, C. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds*, Vol. 35, No. 2-4, 330–354, 2015.
- ANDREOLI, C.; DALARMI, O.; LARA, A.; RODRIGUES, E.; ANDREOLI, F. Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba – RMC. *SANARE, Revista Técnica da SANEPAR*, Vol. 12, No.12, 1999. Disponível em: <<http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/V12/Mananciais/mananciais.html>> Acesso em: 20 abr. 2016.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Polycyclic aromatic hydrocarbons. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=122&id=25>> Acesso em: 31/08/2015.
- AZEVEDO, D.; GERCHON, E.; DOS REIS, E. Monitoring of Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water from Paraíba do Sul River, Brazil . *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 15, No. 2, 292–299, 2004.
- BAKER, R. *Membrane Technology and Applications*. 3. ed. California, John Wiley & Sons, 2012.
- BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H.K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, No. 1016, 11–20, 2003.
- BESSA, M.; BARROS, F.; DA-SILVA, D.; ANDRADE-DE-JESUS, F.; DE-CARVALHO, S. Coleta de água: amostragem em ambientes lóticos. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, Vol. 9, No. 16, 2136, 2013.
- BOERSMA, C.; BREGMAN, J.; ALLAMANDOLA, L. Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northwest Photon Nominated Region of NGC 7023. I. PAH size,



- charge, composition and structure distribution. *The Astrophysical Journal*, No. 769, 117–130, 2013.
- BROWN, J.; PEAKE, B. Determination of colloiddally-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fresh water using C 18 solid phase extraction disks. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 486, 159–169, 2003.
- CANADIAN ENVIRONMENTAL ACT. Priority Substances List Assessment Report: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Government of Canada, 1994.
- CARRASCO, V. PAHs: Comparative biotransformation and trophic transfer of their metabolites in the aquatic environment. Dissertação. University of Eastern Finland, Joensuu, Finlândia, 2013.
- CELINO, J.; CORSEUIL, H.; FERNANDES, M.; HADLICH, G. Persistent toxic substances in surface water of Todos Os Santos Bay, Brazil. *Resources and Environment*, Vol. 2, No. 4, 141–149, 2012.
- CESPÓN, R.R. Desarrollo de métodos analíticos automáticos para la determinación de metales en el medio ambiente laboral. Tese de Doutorado. Universidad de Santiago de Compostella, 2008.
- CHAPMAN, D. Water quality assessments: A guide to the use of biota, sediments and wáter in environmental monitoring. 2.ed., New York: Taylor & Francis, 1996.
- CHARALABAKI, M.; PSILLAKIS, E.; MANTZAVINOS, D.; KALOGERAKIS, N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fiber liquid-phase microextraction. *Chemosphere*, Vol. 60, 690-698, 2005.
- COELHO, E.; FERREIRA, C.; ALMEIDA, C. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 19, No. 6, 1084-1097, 2008.
- COHAB – CT. Companhia de Habitação Popular de Curitiba. Plano Municipal de Regularização Fundiária em Áreas de Preservação Permanente – PRFAPP. Curitiba – PR, 2007.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Resolução CONAMA n° 357, 2005.
- COSTA, A.; FERNANDES, F.; CÁSSIA, J.; COUTRIM, M. Determination of PAHs in Surface Waters from the Doce and Piracicaba Rivers in Brazil. *Journal of Water Resource and Protection*, No. 7, 422-429, 2015.

- CRISTALE, J.; SILVA, F.; MARCHI, R.M. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclética Química*, Vol. 33, No. 4, 2008.
- CURCIO, G. R.; DE SOUSA, L. P.; BONNET, A.; BARDDAL, M. L. Recuperação Ambiental das Margens da Represa do Rio Iraí – Pinhais – PR. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, Vol. 5, No. 1, 522–524, 2007.
- DA LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. Challenges in Green Analytical Chemistry. *RSC green chemistry series 13*. Ed. Cambridge: RSC pub, 2011. Pp 90-94.
- DA SILVA, J. Qualificação, validação-conceitos básicos. 1.ed. 2011.
- DELGADILLO, M.; PEÑA, A.; VILLALOBOS, M. Application of programmed temperature vaporization large volume injection gas chromatography (PTV-LVI-GC) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *J.Mex.Chem.Soc*, Vol. 57 85–91, 2013.
- DUNCAN, D.; HARVEY, F.; WALKER, M.; AUSTRALIAN WATER QUALITY CENTRE. EPA Guidelines: Regulatory monitoring and testing water and wastewater sampling, 2007.
- EDWARDS, S.; JEDRYCHOWSKI, W.; BUTSCHER, M.; CAMANN, D.; KIELTYKA, A.; MROZ, E.; FLAK, E.; LI, Z.; WANG, S.; RAUH, V.; PERERA, F. Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 118, 1326-1331, 2010.
- FARMER, P.; SINGH, R.; KAUR, B.; SRAM, R.; BINKOVA, B.; KALINA, I.; POPOV, T.; GARTE, S.; TAIOLI, E.; GABELOVA, A.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutation Research*, No. 544, 397–402, 2003.
- FERREIRA, V. Otimização de Protocolo Analítico para Extração e Fracionamento de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos em Sedimentos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- FU, S.; FAN, J.; HASHI, Y.; CHEN, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, No. 94, 152–157, 2012.

- GALÁN-CANO, F.; ALCUDIA-LEÓN, M.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Ionic liquid coated magnetic nanoparticles for the gas chromatography/mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters. *Journal of Chromatography A*, No. 1300, 134–140, 2013.
- GALÁN-CANO, F.; BERNABÉ-ZAFÓN, V.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.; RAMIS-RAMOS, G.; VALCÁRCEL, M. Sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using monolithic capillary solid-phase extraction and on-line thermal desorption prior to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, No. 1218, 1802–1807, 2011.
- GARBAN, B.; BLANCHOU, H.; MOTALAY-MASSEI, A.; CHEVREUIL, M. & OLLIVON, D. 2002. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*, No. 36, 5395–5403, 2002.
- GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchimica Acta*, Vol. 177, No. 3, 271–294, 2012.
- GENKINGER, J.; STIGTER, L.; JEDRYCHOWSKI, W.; HUANG, T.; WANG, S.; ROEN, E.; MAJEWSKA, R.; KIELTYKA, A.; MROZ, E.; PERERA, F. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure, antioxidant levels and behavioral development of children ages 6–9. *Environmental Research* Vol. 140, 136–144, 2015.
- GÓMEZ, M.; HERRERA, S.; SOLÉ, D.; GARCÍA-CALVO, E.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Automatic searching and evaluation of priority and emerging contaminants in wastewater and river water by stir bar sorptive extraction followed by comprehensive two-Dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, No. 83, 2638–2647, 2011.
- GOOGLE. Google Earth. Version 7.1.5.1557. 2015. Curitiba, Paraná, Brasil. Disponível em: <[https://www.google.com/maps/d/u/0/print?hl=es&authuser=0&mid=1naieTIJEQshvULV4S3MI2MGM\\_sc&pagew=792&pageh=612&llsw=-25.532137%2C-49.313259&llne=-25.434357%2C-49.078769&cid=mp&cv=UxyeBq60AZQ.es](https://www.google.com/maps/d/u/0/print?hl=es&authuser=0&mid=1naieTIJEQshvULV4S3MI2MGM_sc&pagew=792&pageh=612&llsw=-25.532137%2C-49.313259&llne=-25.434357%2C-49.078769&cid=mp&cv=UxyeBq60AZQ.es)>. Acesso em: 07 mai. 2016.
- GRPCoM – Grupo Rede Paranaense de Comunicação & Lupa Ambiental. Projeto Águas do Amanhã: Um olhar crítico sobre a bacia hidrográfica do Alto Iguaçu. Curitiba – PR, 2011.

- HADIBARATA, T.; FIKRI, M.; RUBIYATNO; ZEE, T.; MOHD, A.; RAZMAN, M.; FULAZZAKY, M.; SENG, B.; NUGROHO, A. Degradation and transformation of anthracene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. *Folia Microbiol.* DOI 10.1007/s12223-013-0221-2, 2013.
- HANDLEY, A.; ADLARD, E. Gas chromatographic techniques and applications. 3.ed. Series. Sheffield Academic Press, 2001.
- HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases, *Annu. Rev. Microbiol.* No. 46, 565–601, 1992.
- HARAYAMA, K. Advances in the field of high-molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbiol Biotechnol*, Vol. 3, No. 2, 132–164, 2010.
- HARITASH, A.; KAUSHIK, C. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, No. 169,1–15, 2009.
- HARRIS, D. Análisis químico cuantitativo. 3.ed. Barcelona, Reverté. 2007. p. 92-93.
- HASSEINE, A.; MENIANI, A.; KORICHI, M. Salting-out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2-propanol) and (water + xylene + methanol). *Desalination*, Vol. 242, 264–276, 2009.
- HIDAL, N.; ISMAIL, A.F.; WRIGHT, C. Membrane Fabrication. Florida, Taylor & Francis Group, 2015.
- HÜBSCHMANN, H. Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications. 2. ed. Weinheim, Alemanha, WILEY-VCH. 2009. p. 231.
- IARC – International Agency for the Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2016. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> Acesso em: 20 fev. 2016.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estados @. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ms&tema=extracaovegetal2013> Acesso em: 20/08/2015.
- JIN, H.; KIM, J.; LEE, H.; MADSEN, E.; JEON, C. Alteromonas as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environmental Science Technology*, Vol. 46, 7731–7740, 2012.

- JONG, W.; KROESE, E.; VOS, J.; LOVEREN, H. Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol Sci* No. 50, Vol. 2, 214-220, 1999.
- KABZINSKI, A.; CYRAN, J.; JUSZCZAK, R. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water (including drinking water) of Lodz. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 11, No. 6, 695-706, 2002.
- KAMANGAR, F.; SCHANTZ, M.; ABNET, C.; FAGUNDES, R.; DAWSEY, S. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, No. 17, Vol. 5, 1262–2168, 2008.
- KEBBEKUS, B.; MITRA, S. *Environmental chemical analysis*. 1.ed., New York: Chapman & Hall, 1998.
- KEITH, L.; TELLIARD, W. ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environmental Science Technology*, Vol. 13, No. 4, 416–423, 1979.
- KIM, K.; JAHAN, S.; KABIR, E.; BROWN, R. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, No. 60, 71-80, 2013.
- KING, S.; MEYER, J.; ANDREWS, A. Screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using hollow fiber membrane solvent microextraction. *Journal of Chromatography A*, Vol. 982, 201-208, 2002.
- KING, A.; READMAN, J.; ZHOU, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, No. 523, 259–267, 2004.
- KWEON, O.; KIM, S.; HOLLAND, R.; CHEN, H.; KIM, D.; GAO, Y.; YU, L.; BAEK, S.; BAEK, D.; AHN, H.; CERNIGLIA, C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology*, Vol. 193, No. 17, , 4326–4337, 2011.
- LAFUENTE, S.; BURGUETE, M.; ALTAVA, B. *Introducción a la Química orgánica*. Editorial Vastelló de la Plana: Universitat Jaume I, 1997.pp 88-97.
- LAGOS, P. Fitopâncton no Reservatório Irai, PR, com ênfase em cianobactérias: variação sazonal em relação às variáveis ambientais. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

- LAMARQUE, A. Fundamentos teórico-práticos de química orgânica. Editorial Brujas, 2008.
- LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. RIMA, 2004. ANVISA
- LATIF, I.; KARIM, A.; ZUKI, A.; ZAMRI-SAAD, M.; NIU, J.; NOORDIN, M. Pulmonary modulation of benzo[a]pyrene-induced hemato- and hepatotoxicity in broilers. *Poult Sci*, No. 89, Vol. 7, 1379–1388, 2010.
- LEITE, N. F. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em sedimentos: Desenvolvimento analítico e diagnóstico ambiental. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- LESAGE, S. Groundwater contamination and analysis at hazardous waste sites. Marcel Dekker, Inc, 1992. Pp 23-24.
- LI, N.; KEE, H. Assessment of Colloid Formation and Physical State Distribution of Trace Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Samples. *Anal. Chem.*, Vol. 73, 5201–5206, 2001.
- LIMA, J.; NAVICKIENE, S.; SILVEIRA, H. Method Validation for SPE Applied to Determination of PAH in Petroliferous Industry Effluent Water. *American Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 2, 971–978, 2011.
- LIMA-CAZORLA, L. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ligeros en aguas superficiales de los ríos Almendares y Luyanó en La Habana. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol. 43, 2012.
- MACHADO, K.; FIGUEIRA, R.; COCCO, L.; FROEHNER, S.; FERNANDES, C.; FERREIRA, P. Sedimentary record of PAHs in the Barigui River and its relation to the socioeconomic development of Curitiba, Brazil. *Science of the Total Environment*, No. 482–483, 42–52, 2014.
- MAIOLI, O.; RODRIGUES, K.; KNOPPERS, B.; AZEVEDO, D. Distribution and sources of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter in water from two Brazilian estuarine systems. *Continental Shelf Research*, No. 31, 1116–1127, 2011.
- MASTO, R.; SARKAR, E.; GEORGE, J.; JYOTI, K.; DUTTA, P.; RAM, L. PAHs and potentially toxic elements in the fly ash and bed ash of biomass fired power plants. *Fuel Processing Technology*, No. 132, 139–152, 2015.

- MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, No. 1040, 259–272, 2004.
- MCMMASTER, M. GC/MS: a practical user's guide. 2. ed. Nova Jersey, Estados Unidos, JOHN WILEY & SONS, Inc. 2008.
- MEIRE, R.; AZEVEDO, A.; TORRES, J. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.*, Vol. 11, No. 2, 188-201, 2007.
- MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica*, Vol. 5, No.4, 249-262, 2013.
- MEYER, P.; ISHIWATARI, R. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry*, Vol. 20, 867–900, 1993.
- MILLER, J.N.; MILLER, J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4.ed. Prentice Hall, 2002.
- MOARES, A.R.; MAGALHÃES, I.R.; SANTANA, F.J.; BONATO, P. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, Vol. 31. No. 3, 637-644, 2008.
- MOHD, M.; SAW, H.; WAN, A.; MOHAMED, N.; ABOUT, E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh milk by hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, No. 00, 1–5, 2012.
- MONTGOMERY, D.C. Diseño y análisis de experimentos. 2.ed. John Wiley & Sons, Inc, New York, 2004.
- NEFF, J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment Sources, fate, and biological effects. Applied Science Publishers, Londres, 1979.
- BARROS NETO, B.; SCARDMINIO, I.; BRUNS, R. Como fazer experimentos - pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Campinas/SP: Ed. Unicamp, 2010.
- NETTO, A.; DIAS, J.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. *Química Nova*, Vol. 23, No. 6, 765–773, 2000.

- NOKWETHEMBA, P. Modification, development and application of extraction methods for PAHs in sediments and water. Tese de Doutorado. University of the Witwatersrand, Johannesburg, 2012.
- OLIVELLA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere*, Vol. 63, 116–131, 2006.
- OLSON, M.; IVERSON, J.; FURLONG, E.; SCHROEDER, M. Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Sediment by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. U.S. Department of the Interior. Water-Resources Investigations Report 03-4318, 2004.
- PARRON, L.; MUNIZ, D.; PEREIRA, C. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa Florestas. Colombo, Paraná, Brasil, 2011.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; EINAR, K. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, No. 71, 2650–2656, 1999.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; EINAR, K. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, No. 1184, 132–142, 2008.
- PEDERSEN-BJERGAARD S, RASMUSSEN KE. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.*, Vol. 71, 2650–2656, 1999.
- PEDERSEN-BJERGAARD S, RASMUSSEN KE. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1184, 132–142, 2008.
- PENTEADO, J.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2190–2193, 2008.
- PEÑA, A.; MORALES, J.; LABASTIDA, C.; CAPELLA, S. Extracción en Fase Sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Gases: Aplicación a Organismos Marinos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* Vol. 19, No. 1, 13–23, 2003.



- PERERA, F.; LI, Z.; WHYATT, R.; HOEPNER, L.; WANG, S.; CAMANN, D.; RAUH, V. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics*, No. 124 ,e195–e202, 2009.
- PERERA, F.; RAUH, V.; WHYATT, R.; TSAI, W.; DIAZ, D.; HOEPNER, L.; BAR, D.; TU, Y.; CAMANN, D.; KINNEY, P.. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3years of life among inner-city children. *Environmental Health Perspectives*, No. 114, 1287–1292, 2006.
- PERERA, F.; DELIANG, T.; WANG, S.; VISHNEVETSKY, J.; ZHANG, B.; DIAZ, D.; CAMANN, D.; RAUH, V. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. *Environmental Health Perspectives*, No. 120, 921–926, 2012.
- PERERA, F.; WANG, S.; RAUH, V.; ZHOU, H.; STIGTER, L.; CAMANN, D.; JEDRYCHOWSKI, W.; MROZ, E.; MAJEWSKA, R. Prenatal exposure to air pollution, maternal psychological distress, and child behavior. *Pediatrics*, No. 132, e1284–e1294, 2013.
- PEREIRA, A.; MOREIRA, J.; DIAS, A.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.; OLIVEIRA, A.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. *Química Nova*, Vol. 23, No. 6, 2000.
- POLAKIEWICZ, L. Estudo de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente – SP utilizando diatomito como material adsorvente. Tese de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN “Autarquia Associada à Universidade de São Paulo”, São Paulo, 2008.
- POSTER, D.; SCHANTZ, M.; SANDER, L.; WISE, S. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, No. 386, 859–881, 2006.
- PRODUTOS FORESTAIS – ERVA MATE. Disponível em:  
<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Erva\\_Mate\\_2013\\_2014.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Erva_Mate_2013_2014.pdf)>.  
Acesso em: 19/05/2015.
- PSILLAKIS E, KALOGERAKIS N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 10, 565–574, 2003.
- Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

- RAHIMI, M.; NOROOZIAN, E. Frits coated with nano-structured conducting copolymer for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples and liquid chromatographic analysis. *Talanta*, No. 123, 224–232, 2014.
- RATOLA, N.; ALVES, A.; KALOGERAKIS, N.; PSILLAKIS, E.; Hollow-fiber liquid phase microextraction: A simple and fast cleanup step used for PAHs determination in pine needles. *analytica chimica acta*, No. 618, 70–78, 2008.
- REN, A.; QIU, X.; JIN, L.; MA, J.; LI, Z.; ZHANG, L. Association of selected persistent organic pollutants in the placenta with the risk of neural tube defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, No. 108, Vol. 31, 12770–12775, 2011.
- RENTZ, J.; ALVAREZ, P.; SCHNOOR, J. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*, Vol. 136, 477–484, 2005.
- REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI, M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1116, No. 1-2, 1–9, 2006.
- RIBANI, M.; GRESPAN, C.; COSTA, L. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. *Química Nova*, Vol. 27, No. 5, 2004.
- RICE, H.; BAKER, B. Workplace hazards to women's reproductive health. *Minn Med* No. 90, Vol. 9, 44–47, 2007.
- RODIL, R.; SCHELLIN, M.; POPP, P. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, No. 1163, 288–297, 2007.
- ROLLA, M.; RAMOS, S.; CARVALHO, M.; MOTA, H.; PIRES-DE-ALMEIDA, A. Manual de procedimentos de coleta e metodologias de análise de água. Sistema CEMIG de monitoramento e controle de qualidade da água de reservatórios. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2011.
- ROSE, N.; RIPPEY, B. The historical record of PAH, PCB, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west Scotland. *Environmental pollution*, No. 117, 121–132, 2002.

- ROSTAGNO, M.; PRADO, J. Natural product extraction: principles and applications. RSC Pub, Cambridge, 2013. Pp 66-67.
- SAMANTA, S.; SINGH O.; JAIN, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol, No. 20, Vol. 6, 243-248, 2002.
- SANTANA-ROMERO, J.; VALDÉS-CALLADO, M.; OLIVARES-RIEUMONT, S; CELINO, J.; CORSEUIL, H.; FERNANDES, M.; HADLICH, G. Persistent toxic substances in surface water of Todos Os Santos Bay, Brazil. Resources and Environment, Vol. 2, No. 4, 141-149, 2012.
- SAWCZUK, A.; DE-LARA, M.; MARTINS, TSAWCZUK, A.; DE-LARA, M.; MARTINS, T. Rios Urbanos: Estudo de caso do rio Belém, Curitiba/PR. 2013. Trabalho apresentado no XX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, Beto Gonçalves-RS, Brasil, 2013.
- SCOTT, R.P. Introduction to gas analytical gas chromatography. 2.ed. Marcel Dekker, Inc, 1998.
- SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Governo do Estado do Paraná. Bacias Hidrográficas do Paraná – Curitiba – PR, 2010.
- SCOTT, R.P. Introduction to gas analytical gas chromatography. 2.ed. Marcel Dekker, Inc, 1998.
- SILLIMAN J.; MEYERS P.; EADIE, B. Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials? Organic Geochemistry, Vol. 29, 1737–1744, 1998.
- SKUPÍŃSKA, K.; MISIEWICZ, I.; KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Physicochemical Properties, Environmental Appearance and Impact on Living Organisms. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 61, No. 3, 233-240, 2004.
- SMALLWOOD, I. Handbook of organic solvent properties. London, Inglaterra, JOHN WILEY & SONS, Inc. 1996.
- STELLMAN, J. Encyclopedia of occupational health and safety. 4. Ed. Rev. aum. Geneva: International Labour Office, c1998. 104.300p.
- SUDERHSA. Qualidade das águas interiores do Estado do Paraná. 1987 – 1995. SUDERHSA. 1998.
- SUREHMA. Bacia do Iguaçu. Conselho de Recursos Hídricos. Curitiba: 1992. Disponível em: <<http://www.recursoshidricos.pr.gov.br/arquivos/File/enquadramento-b-iguacu.pdf>> Acesso em: 20 fev. 2016.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S.; Pharm. Technol. 1998, 2, 12.

- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 535-552, 2004.
- TRIÑANES, S.; PENA, M.; CASAIS, M. MEJUTO, M. Development of a new sorptive extraction method based on simultaneous direct and headspace sampling modes for the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. Talanta, No. 132, 433–442, 2015.
- TSENG, W.; CHEN, P.; HUANG, S. Optimization of two different dispersive liquid–liquid microextraction methods followed by gas chromatography–mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. Talanta, No. 120, 425–432, 2014.
- TUNG SI HO; PEDERSEN-BJERGAARD S, RASMUSSEN KE. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction. Comparison with conventional liquid-liquid extraction. Journal of Chromatography A, Vol. 963, 3–17, 2002.
- UNWIN, J.; COCKER, J.; SCOBIE, E.; CHAMBERS, H. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. Ann Occup Hyg, No. 50, Vol. 4, 395-403, 2006.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency – Method 525.3 Determination of semivolatile organic chemicals in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS), 2012.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency – Surface Waters. Field operations and methods for measuring the ecological condition of non-wadeable rivers and streams, 2000.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Methods for the determination of organic compounds in drinking water-supplement III, EPA/600/R-95-131, National Technical Information Service, PB95-261616, Washington D.C., 1995.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Methods for the determination of organic compounds in drinking water supplement I, EPA/600/4-90/020, National Technical Information Service, PB91-146027, Washington D.C, 1990.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Method 610-polynuclear aromatic hydrocarbons, PART 136 guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants; appendix A: methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater, 40CFR136.1, US Environmental Protection Agency, Washington D.C., 2005.

- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Method 625-base/ neutrals and acids, PART 136 guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants; appendix A: methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater, 40CFR136.1, US Environmental Protection Agency, Washington D.C., 2005.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency Method 1625 revision B - semivolatile organic compounds by isotope dilution GC–MS, PART 136 guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants; appendix A: methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater, 40CFR136.1, US Environmental Protection Agency, Washington D.C., 2005.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Definition and procedure for the determination of the method detection limit—Appendix B to part 136. 40 CFR Ch.I, 2002.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Physical/Chemical Methods. Ch. 01 - Quality control; Ch. 02 - Choosing the correct procedure; Ch. 04- Organic Analytes; Ch. 09 - Sampling plan, rev. 03, 1996.
- VALCÁRCEL, C.M.; GÓMEZ, H.A. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté, S.A., 1988.
- VILA, J.; TAULER, M.; GRIFOLL, M. Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, No. 33, 95–102, 2015.
- WANG, Z.; LI, J.; HESHAM, A.; HE, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; YANG, M. Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Science of the Total Environment*, No. 373, 356 – 362, 2007.
- WANG, X.; MITRA, S. Enhancing micro-scale membrane extraction by implementing a barrier film. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1122, 1-6, 2006.
- WELLS, P.; McCALLUM, G.; LAM, K.; HENDERSON, J.; ONDOVCIK, S. Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. *Birth Defects Res C Embryo Today*, No. 90, Vol. 2, 103–109, 2010.
- WILSON, W.; HEWITT, U.; MILLER, M.; CAMPIGLIA, A. Water analysis of the sixteen environmental protection agency—polycyclic aromatic hydrocarbons via solid-phase nanoextraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1345, 1–8, 2014.

- WU, H.; WANG, X.; LIU, B.; LU, J.; DU, B.; ZHANG, L.; JI, J.; YUE, Q.; HAN, B. Flow injection solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes packed micro-column for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, No. 1217, 2911–2917, 2010.
- YOSHIMINE, R.; CARREIRA, R.; SCOFIELD, A.; WAGENER, A. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels (*Perna perna* Linnaeus 1758). *Marine Pollution Bulletin*, No. 64, 2581–2587, 2012.
- ZHANG, L.; DONG, L.; REN, L.; SHI, S.; ZHOU, L.; ZHANG, T.; HUANG, Y. Concentration and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in the surface water of the Yangtze River Delta, China. *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 24, No. 2, 335–342, 2012.
- ZHANG, S.; ZHANG, Q.; DARISAW, S.; EHIE, O.; WANG, G. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*, Vol. 66, 1057-1069, 2007.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - Resultados do planejamento fatorial $2^3$ para otimização da HF-LPME (n=3)

E	V	Co	Sal	Área <sup>Φ 3</sup>															
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	-	-	53,2	15,4	4,4	0,63	1,10	1,10	4,28	5,72	6,00	7,10	6,81	6,44	5,04	10,5	3,18	4,21
2	+	-	-	16,2	0,86	1,8	7,7	9,21	30,6	82,0	105,0	124,0	163,0	138,0	178,0	168,0	122,0	166,0	173,0
3	-	+	-	64,6	6,2	9,7	8,7	6,83	6,15	26,3	30,3	37,6	45,6	43,7	47,8	39,8	29,7	37,2	37,0
4	+	+	-	4,2	1,7	0,39	0,32	0,42	0,20	1,79	2,39	1,90	3,11	2,45	2,47	1,55	0,95	0,85	1,22
5	-	-	+	3,2	0,28	2,8	0,18	0,36	0,14	1,33	1,38	1,82	2,65	2,76	2,54	2,16	0,35	0,30	0,36
6	+	-	+	37,4	0,40	1,4	0,94	0,38	0,41	7,60	5,31	6,14	6,58	4,67	5,20	3,69	0,51	1,85	3,70
7	-	+	+	29,4	1,2	2,4	2,05	1,33	3,52	8,50	8,36	8,29	10,6	8,35	9,16	7,05	6,29	7,13	8,00
8	+	+	+	27,9	0,51	1,2	1,51	0,67	2,67	3,91	4,86	4,46	6,53	5,94	6,57	4,37	2,61	1,98	4,43
*9	0	0	0	34,5	1,8	6,7	2,35	1,94	6,47	8,07	10,5	8,01	10,8	8,44	8,8	7,68	3,77	5,09	6,25
*10	0	0	0	35,3	1,6	3,3	2,70	2,30	8,47	18,6	22,4	22,6	30,4	28,6	33,0	25,7	21,8	27,2	26,0
*11	0	0	0	39,9	1,9	8,1	3,74	3,33	13,9	30,4	35,2	38,0	48,6	46,0	52,3	45,2	36,9	46,1	44,1

Φ1: nafeneno 2: acenaftileno 3: acenafteno 4: fluoreno 5: fenantreno 6: antraceno 7: fluoranteno 8: pireno 9: benzo[a]antraceno 10: criseno 11: benzo[b]fluoranteno 12: benzo[k]fluoranteno 13: benzo[a]pireno 14: indeno[1,2,3-cd]pireno 15: dibenzo[a,h]antraceno 16: benzo[g,h,i]perileno

<sup>3</sup> Dados arredondados expressos como  $1 \times 10^5$

E: experimento

V: Velocidade

Co: cosolvente

Sal: % (m/v) NaCl

**APÊNDICE 2 - Resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para otimização da HF-LPME**

<b>E</b>	<b>V</b>	<b>Co</b>	<b>Área<sup>Φ3</sup></b>															
			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>1</b>	-	-	53,2	15,4	4,42	0,64	1,10	1,10	4,28	5,72	6,00	7,10	6,81	6,44	5,04	10,5	3,18	4,21
<b>2</b>	+	-	16,2	0,86	1,87	7,71	9,21	30,6	82,0	105,0	124,0	163,0	138,0	178,0	168,0	122,0	166,0	173,0
<b>3</b>	-	+	64,6	6,21	9,69	8,77	6,83	6,15	26,3	30,3	37,6	45,6	43,7	47,8	39,8	29,7	37,2	37,0
<b>4</b>	+	+	42,4	1,74	0,39	3,23	0,42	0,20	1,79	2,39	1,90	3,11	2,45	2,47	1,55	0,95	0,85	1,22
<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	34,5	1,81	6,26	2,35	1,94	6,47	8,07	10,5	8,01	10,8	8,44	8,88	7,68	3,77	5,09	6,25
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	35,3	1,61	3,34	2,70	2,30	8,47	18,6	22,4	22,6	30,4	28,6	33,0	25,7	21,8	27,2	26,0
<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	39,9	1,95	8,07	3,74	3,33	13,9	30,4	35,2	38,0	48,6	46,0	52,3	45,2	36,9	46,1	44,1

<sup>Φ</sup>**1:** nafaleno **2:** acenaftileno **3:** acenafteno **4:** fluoreno **5:** fenantreno **6:** antraceno **7:** fluoranteno **8:** pireno **9:** benzo[a]antraceno **10:** criseno **11:** benzo[b]fluoranteno **12:** benzo[k]fluoranteno **13:** benzo[a]pireno **14:** indeno[1,2,3-cd]pireno **15:** dibenzo[a,h]antraceno **16:** benzo[g,h,i]perileno

<sup>3</sup> Dados arredondados expressos como 1 x 10<sup>5</sup>

**E:** experimento

**V:** Velocidade

**Co:** cosolvente



**APÊNDICE 3 - Resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para otimização da HF-LPME**

<b>E</b>	<b>Cn</b>	<b>t</b>	<b>Área<sup>Φ3</sup></b>															
			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>1</b>	-	-	89,5	13,8	21,9	20,1	14,6	16,9	22,0	29,8	29,8	40,4	33,5	40,3	30,4	18,6	29,0	29,5
<b>2</b>	+	-	79,6	5,37	9,29	8,47	8,89	14,5	23,5	26,7	28,2	38,7	32,6	37,3	27,9	19,2	27,1	29,4
<b>3</b>	-	+	101,0	18,3	28,4	15,6	11,5	18,3	25,7	33,1	6,16	6,50	5,71	4,19	2,98	1,06	1,72	2,67
<b>4</b>	+	+	51,0	3,05	4,82	7,60	4,34	11,9	20,3	26,4	14,0	18,3	15,1	16,4	10,5	7,66	9,51	11,5
<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	50,9	0,62	0,96	1,31	1,27	3,41	5,48	7,48	8,32	12,8	10,2	13,1	7,45	5,66	8,61	9,32
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	44,2	3,85	13,8	3,54	2,3	18,3	25,5	35,2	47,3	40,9	52,1	33,3	46,6	76,6	49,7	23,3
<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	66,4	4,91	13,9	14,1	1,33	12,5	27,9	32,7	40,2	45,4	52,3	48,7	45,7	38,0	37,8	45,9

<sup>Φ1</sup>: nafaleno **2**: acenaftileno **3**: acenafteno **4**: fluoreno **5**: fenantreno **6**: antraceno **7**: fluoranteno **8**: pireno **9**: benzo[a]antraceno **10**: criseno **11**: benzo[b]fluoranteno **12**: benzo[k]fluoranteno **13**: benzo[a]pireno **14**: indeno[1,2,3-cd]pireno **15**: dibenzo[a,h]antraceno **16**: benzo[g,h,i]perileno

<sup>3</sup> Dados arredondados expressos como 1 x 10<sup>5</sup>

**E**: experimento

**Cn**: Concentração de Acetona (% v/v)

**t**: cosolvente